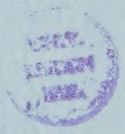
Polare Metaboliten des Antidepressivum Amitriptylin bei Ratte und Mensch: Isolierung und Strukturaufklärung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Brunhilde Baier-Weber
aus Bad Mergentheim

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0012

Polare Metaboliten des Antidepressivum Amitriptylin bei Ratte und Mensch: Isolierung und Strukturaufklärung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Brunhilde Baier-Weber
aus Bad Mergentheim

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 7. 1984

Dekan: Prof. Dr. Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ursula Breyer-Pfaff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hermann P. T. Ammon

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
	Abkürzungen	5
	Strukturformeln	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1.	Geräte	7
2.2.	Chromatographie-Material	8
2.3.	Substanzen	10
2.4.	Untersuchungen mit Rattengalle	13
2.4.1.	Reinigung der Substanzen	13
2.4.1.1.	Reinigung der ^{14}C-Amitriptylin-Lösung	13
2.4.1.2.	Reinheit des unmarkierten Amitriptylins	15
2.4.1.3.	Reinheit von Nortriptylin	15
2.4.1.4.	Reinigung von E- und Z-10-Hydroxy-amitriptylin	15
2.4.1.5.	Reinigung von E- und Z-10-Hydroxy-nortriptylin	15
2.4.1.6.	Reinigung von 2-Hydroxy-amitriptylin und -nortriptylin	15
2.4.2.	Bestimmung der spezifischen Extinktionsdifferenz	16
2.4.3.	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	16
2.4.4.	Dosierung	17
2.4.5.	Radioaktivitätszählung	17
2.4.6.	Gewinnung von Rattengalle	17
2.4.7.	Aufarbeitung der enzymatisch dekonjugierten Galle	18

		Seite
2.4.7.1.	Inkubation	18
2.4.7.2.	Extraktion der freigesetzten Alkohole und Phenole	19
2.4.7.3.	Nicht-extrahierbare Fraktion	19
2.4.7.4.	Nicht-saure Fraktion	19
2.4.7.5.	Behandlung von Metabolitenfraktionen mit Diazomethan	20
2.4.7.6.	Dünnschichtchromatographische Trennung	20
2.4.7.7.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	21
2.4.8.	Aufarbeitung der nicht dekonjugierten Galle	22
2.4.8.1.	Vorreinigung über Amberlite XAD-4	22
2.4.8.2.	Extrahierbare Fraktion	22
2.4.8.3.	Nicht-extrahierbare Fraktion	22
2.4.8.4.	Dünnschichtchromatographische Trennung	22
2.4.8.5.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	23
2.4.9.	Vergleichende Aufarbeitung enzymatisch dekonjugierter und nicht dekonjugierter Galle	23
2.4.10.	Identifizierung der Metaboliten	24
2.4.10.1.	Hydrolytische Spaltungen	24
2.4.10.1.1.	Enzymatische Hydrolyse	24
2.4.10.1.2.	Saure Hydrolyse	24
2.4.10.2.	Dünnschichtchromatographische Trennung und R_F-Werte	25
2.4.10.2.1.	Nachweis der Aglyka	25
2.4.10.2.2.	Nachweis der Glucuronsäure	25
2.4.10.2.3.	Versuch des Nachweises von Aminosäuren	26

Seite

2.4.10.2.3.1. Dansylierung von Aminosäuren 26

2.4.10.2.3.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von dansylierten Aminosäuren 27

2.4.10.2.3.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie der dansylierten Aminosäuren 27

2.4.10.3. Farbreaktionen auf dem Chromatogramm 27

2.4.10.3.1. Farbreaktionen zum Aglykon-Nachweis 27

2.4.10.3.2. Farbreaktionen zum Glucuronsäure-Nachweis 28

2.4.10.4. Chemische Reaktion 29

2.4.10.4.1. Acetylierung der Glucuronide 29

2.4.10.4.2. Acetylierung der Vergleichssubstanzen 29

2.4.10.4.3. Enzymatische Hydrolyse der acetylierten Verbindungen 29

2.4.10.4.4. Extraktion der hydrolysierten Verbindungen 30

2.4.10.4.5. Dünnschichtchromatographische Trennung 30

2.4.10.5. Synthese von Glucuroniden 30

2.4.10.5.1. Präparation von Mikrosomen 30

2.4.10.5.2. Eiweißbestimmung 31

2.4.10.5.3. Inkubation mit Lebermikrosomen 32

2.4.10.5.4. Extraktion aus dem Inkubationsgemisch 33

2.4.10.5.5. Reinigung des synthetisierten Glucuronids 33

2.4.10.5.6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie der synthetisierten Glucuronide 33

2.4.10.6. UV-Spektrophotometrie 33

2.4.10.6.1. Messung der Glucuronide 33

2.4.10.6.2. Messung der Aglyka 34

2.4.10.6.3. Rückgewinnung 34

		Seite
2.4.10.7.	Strukturaufklärung durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie	34
2.4.10.7.1.	FAB-Massenspektrometrie	34
2.4.10.7.2.	^{1}H-Kernresonanzspektroskopie	35
2.5.	Untersuchungen mit menschlichem Urin	36
2.5.1.	Versuch mit ^{14}C-markiertem Amitriptylin	36
2.5.1.1.	Reinigung des ^{14}C-markierten Amitriptylins	36
2.5.1.2.	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	36
2.5.1.3.	Dosierung	36
2.5.1.4.	Elimination	36
2.5.2.	Untersuchung von Patientenharn	37
2.5.3.	Aufarbeitung des Harns	37
2.5.4.	Vergleichende Aufarbeitung von inkubiertem und nicht inkubiertem Urin	37
2.5.5.	Identifizierung der Metaboliten	38
2.6.	Pharmakologische Testung	38
2.6.1.	Prinzip des Tests	38
2.6.2.	Beschreibung des Versuchs	38
2.6.3.	Konzentrationen der eingesetzten Lösungen	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Elimination von ^{14}C-Amitriptylin beim Menschen	40
3.2.	Isolierung und Trennung der Metaboliten aus Rattengalle und Menschenharn	41
3.2.1.	Vorreinigung	41
3.2.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	48

		Seite
3.3.	Versuche zum Nachweis von Glutathion-Konjugaten	53
3.3.1.	Vergleich der Aufarbeitungen ohne und mit enzymatischer Dekonjugation	53
3.3.2.	Vergleich der Aufarbeitungen ohne und mit Diazomethan-Behandlung	53
3.3.3.	Ergebnisse der Analyse auf Aminosäuren	54
3.4.	Identifizierung der Metaboliten	56
3.4.1.	Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Aglyka	56
3.4.2.	Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse	58
3.4.3.	Acetylierung	59
3.4.4.	Biosynthese der Glucuronide	61
3.4.4.1.	Inkubation mit Lebermikrosomen	61
3.4.4.1.1.	Versuche zur Bestimmung der notwendigen Inkubationsdauer	61
3.4.4.1.2.	Ausbeute der Glucuronidsynthese	62
3.4.4.2.	Glucuronidsynthese in vivo	62
3.4.5.	UV-Spektrophotometrie	68
3.4.6.	Strukturaufklärung durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie	71
3.4.7.	Zusammenfassung der identifizierten Konjugate	81
3.5.	Pharmakologische Testung	82
4.	DISKUSSION	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	96

1. EINLEITUNG

Pharmakologische und vor allem toxische Wirkungen von Arzneimitteln werden oft über Metaboliten ausgeübt, die im Organismus durch Oxidations- und Konjugationsreaktionen entstehen, seltener durch Reduktion, Hydrolyse und weitere Reaktionen. Es ist daher wünschenswert, das Schicksal viel verwendeter Medikamente vollständig aufzuklären. Dieses Ziel konnte z.B. für einige Analgetica und Sedativa erreicht werden durch Einbeziehung polarer Konjugate in die Analyse (Howie et al., 1977; Böttcher, 1982). Bei den therapeutisch viel verwendeten tricyclischen Antidepressiva ist man noch weit entfernt davon.

Amitriptylin (AT) und Nortriptylin (NT) sind zwei der am meisten verwendeten tricyclischen Antidepressiva. Wie alle Psychopharmaka besitzen sie eine hohe Lipidlöslichkeit. Sie werden nach oraler Gabe aus dem Magen-Darm-Trakt gut resorbiert und verteilen sich im ganzen Organismus (Mc Mahon et al., 1963; Corona und Facino, 1968; Knapp et al., 1972; Biggs et al., 1979).
Der Metabolismus von AT und NT ist ein Beispiel dafür, daß der Organismus lipophile Pharmaka in wasserlösliche Derivate umwandelt und diese via Blutkreislauf in den Harn ausscheidet.

Für AT und NT scheint neben der Demethylierung die aliphatische Hydroxylierung an den C-Atomen 10 und 11 der wichtigste Stoffwechselschritt zu sein. AT wird von Mensch und Hund zu 10-Hydroxy-amitriptylin (10-OH-AT), Amitriptylin-N-oxid (AT-NO), NT, 10-Hydroxy-nortriptylin (10-OH-NT), Didesmethyl-amitriptylin (DM_2-AT) und 10-Hydroxy-didesmethyl-amitriptylin (10-OH-DM_2-AT) metabolisiert (Eschenhof und Rieder, 1969; Hucker et al., 1977; Biggs et al., 1979).
NT wird von Ratte und Mensch zu 10-OH-NT, DM_2-AT und 10-OH-DM_2-AT metabolisiert (Mc Mahon et al., 1963; Eschenhof und Rieder, 1969; De Leenheer und Heyndrichx, 1971; Hammar et

al., 1971; Bertilsson und Alexanderson, 1972; Knapp et al., 1972; Whitnack et al., 1972).

Corona und Facino (1968) und Facino et al. (1970) beschrieben auch die Bildung von 10,11-Dihydroxy-amitriptylin (10,11-$(OH)_2$-AT) beim Kaninchen, während die Identifizierung von phenolischen Metaboliten beim Menschen und bei der Ratte erst Breyer-Pfaff et al. (1980) gelang.

Hucker et al. (1977) beobachteten beim Hund einen oxidativen Angriff am aromatischen Ringsystem, der zur Bildung eines 1,2-Dihydrodiols von AT führte. Die Bildung von Dihydrodiolen aus aromatischen Verbindungen verläuft nach heutigen Erkenntnissen über Epoxide (Horning et al., 1972; Oesch, 1973; Jerina und Daly, 1974; Frigerio et al., 1976).

Epoxide sind elektrophile Zwischenprodukte bei der Biotransformation von aromatischen und olefinischen Verbindungen zu den entsprechenden Phenolen und Dihydrodiolen, die häufige Entgiftungsprodukte dieser Substanzen sind (Grover et al., 1972; Keysell et al., 1972; Strafford et al., 1974).

Glutathion-Konjugate aromatischer Kohlenwasserstoffe entstehen über Epoxide als reaktionsfähige Zwischenstufen. Man ist der Meinung, daß die Konjugation der reaktiven und potentiell toxischen Epoxide mit Glutathion zur Detoxifizierung führt (Boyland und Williams, 1965).
Es wird angenommen, daß alternativ zur Reaktion mit der SH-Gruppe des Glutathions auch Bindung an Protein-SH-Gruppen und andere Nucleophile eintreten kann und damit toxische oder allergische Reaktionen initiiert werden. Allergien treten bei AT-behandelten Patienten zwar selten, jedoch gelegentlich auf (Morgan, 1969; Yon, 1975; Anderson und Herrikson, 1978).

Ein anderer möglicher Mechanismus geht von dem bekannten Zerfall von N-Oxiden tertiärer Amine aus, der zu Olefinen führt (Cope et al., 1949 und 1955; Raaflaub, 1967; Borchert et al., 1977; Hucker et al., 1977). N-Oxide als Metaboliten

von tertiären Aminen sind wiederholt nachgewiesen worden (Fishman et al., 1962; Baker und Chaykin, 1962; Christiansen et al., 1967). Christiansen et al. (1967) und Goldenberg et al. (1964) beobachteten, daß beim Menschen ungefähr 1 % des verabreichten Imipramin und Promazin als N-Oxid ausgeschieden wird. Santagostino et al. (1974) fanden von AT-N-Oxid etwa die gleiche Menge im menschlichen Urin.
Die durch Cope-Elimination aus N-Oxiden entstehenden Olefine könnten oxidativ in Epoxide übergehen und damit zu Konjugationsreaktionen führen.
Borchert et al. (1977) identifizierten das 2',3'-Diol von 9,9-Dioxopromethazin und erhielten Hinweise darauf, daß dieses Biotransformationsprodukt aus der durch Cope-Elimination des N-Oxids entstandenen Allylverbindung über den Epoxid-Weg gebildet wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollten die bei der Metabolisierung von AT und NT entstehenden polaren Verbindungen, die sich nicht aus wäßriger Lösung in organische Lösungsmittel extrahieren lassen, untersucht werden. Da in diesen Verbindungen Glutathion-Konjugate und deren biochemische Abbauprodukte vermutet worden waren, wurden Konjugate mit Glucuronsäure und Schwefelsäure durch enzymatische Hydrolyse gespalten und die entstandenen Aglyka durch Extraktion entfernt. In dem sogenannten "nicht-extrahierbaren Anteil" der Metaboliten, über dessen Größe von ca.5 % man durch den Einsatz radioaktiv markierter Substanzen Auskunft erhielt, wurden Versuche unternommen, Glutathion-Konjugate nachzuweisen.

Da weder in der Rattengalle noch im menschlichen Urin Glutathion-Konjugate zu finden waren, wurden Galle und Urin teils mit, teils ohne enzymatische Dekonjugation aufgearbeitet und die enzymatisch dekonjugierten mit den nicht inkubierten Fraktionen verglichen.

Die Konjugation mit Glucuronsäure, die durch mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase katalysiert wird, ist ein Stoffwechselweg, durch den der Säugetierorganismus eine große Menge von lipidlöslichen Xenobiotica und endogenen Verbindungen wie Steroide und Bilirubin biologisch inaktiviert (Dutton, 1966). Sie werden auf diese Weise in eine wasserlösliche Form überführt und so für die Ausscheidung über die Nieren bzw. die Galle vorbereitet.

Glucuronide sind gewöhnlich wasserlösliche und stark saure Verbindungen. Deshalb sind sie pharmakologisch inert und werden schnell ausgeschieden (Smith und Williams, 1966).

Eine Verbindung muß ein Molekulargewicht von ungefähr 300 - 400 und amphiphile Eigenschaften aufweisen, um aus der Galle ausgeschieden zu werden (Smith, 1966; Millburn et al., 1967; Michel, 1968; Fishman, 1970). Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht werden bei allen Spezies in der Galle schlecht ausgeschieden. Wenn das Molekulargewicht von 325 $\pm$ 50 erreicht oder überschritten wird, nimmt die Ausscheidungsrate in der Galle zu, und ihr Ausmaß ist speziesabhängig. Während Ratte und Hund als gute Gallenausscheider gelten, sind Kaninchen und Meerschweinchen eher schlechte Gallenausscheider (Abou-El-Makarem et al., 1967).

Eine andere Möglichkeit der Entgiftung ist die direkte chemische Veränderung z.B. durch Oxidation oder Reduktion, an die sich gegebenenfalls eine Konjugationsreaktion anschließt.

Auf Grund des gleichen Metabolitenspektrums der inkubierten und der nicht inkubierten Fraktionen von Rattengalle und Menschenharn war zu vermuten, daß es sich in allen Fällen um Glucuronide handelte, die in dem Falle der Behandlung der Probe mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase eben nicht vollständig gespalten wurden.

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich dann auf die Isolierung und Identifizierung der Glucuronide von hydroxylierten Amitriptylin-Metaboliten und die pharmakologische Testung der in größter Menge auftretenden Metaboliten.

ABKÜRZUNGEN

Metaboliten von Amitriptylin und Nortriptylin:

AT	Amitriptylin
2-OH-AT	2-Hydroxy-amitriptylin
E-10-OH-AT	10-Hydroxy-amitriptylin, E-Isomer
Z-10-OH-AT	10-Hydroxy-amitriptylin, Z-Isomer
$10,11\text{-}(OH)_2\text{-AT}$	10,11-Dihydroxy-amitriptylin
$OH\text{-}OCH_3\text{-AT}$	2-Hydroxy-3-methoxy (oder 3-Hydroxy-2-methoxy)-amitriptylin
NT	Nortriptylin
2-OH-NT	2-Hydroxy-nortriptylin
E-10-OH-NT	10-Hydroxy-nortriptylin, E-Isomer
Z-10-OH-NT	10-Hydroxy-nortriptylin, Z-Isomer
$10,11\text{-}(OH)_2\text{-NT}$	10,11-Dihydroxy-nortriptylin
$E\text{-}10\text{-}OH\text{-}DM_2\text{-AT}$	10-Hydroxy-didesmethyl-amitriptylin, E-Isomer

Sonstige Abkürzungen:

Dansylchlorid	5-(Dimethylamino)-naphthalin-sulfonsäurechlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
dpm	Zerfälle pro Minute
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAB	Fast Atom Bombardment
Gluc	Glucuronid
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
i.p.	intraperitoneal
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Sa.	Summe
U	internationale Einheit (für Enzyme)
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute

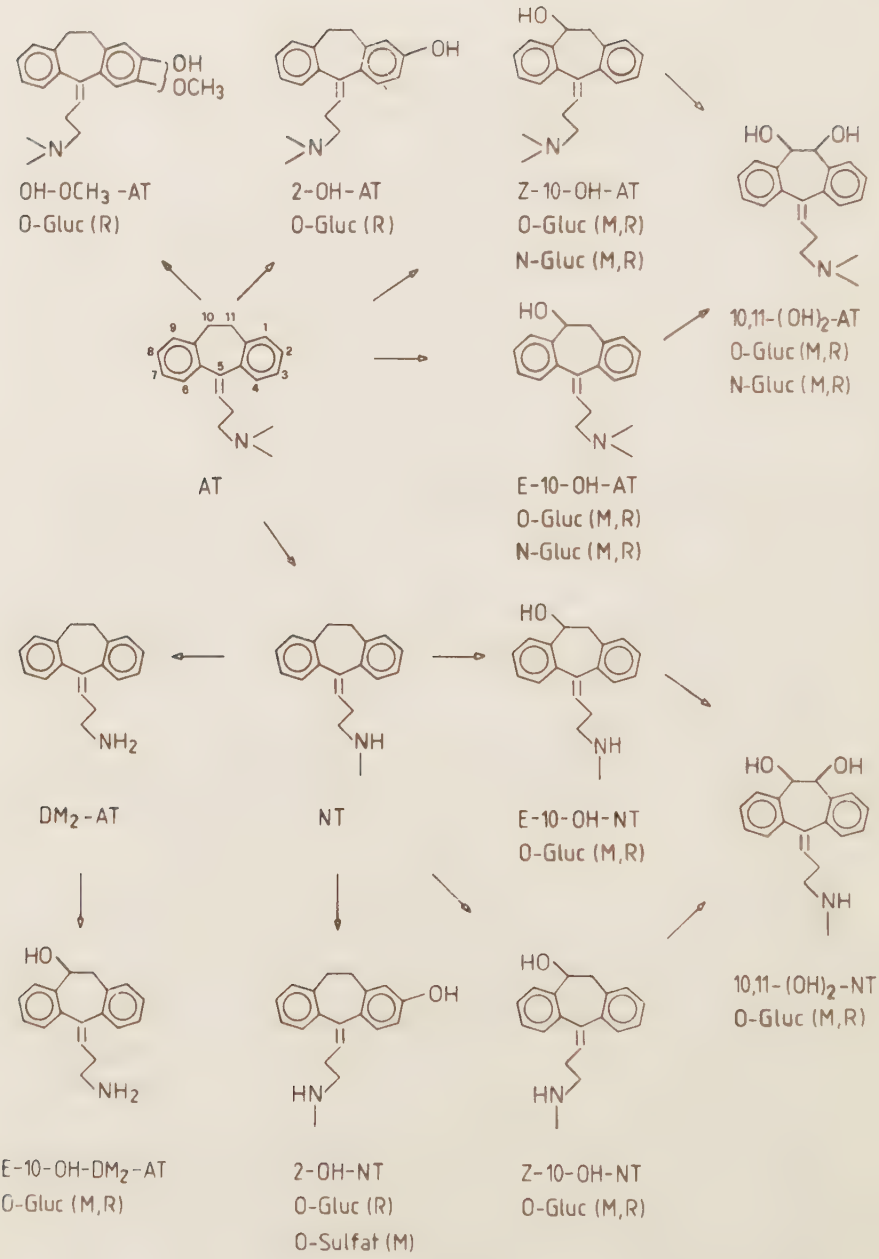


Abb.1: Strukturformeln von AT- und NT-Metaboliten, die als Konjugate im menschlichen Harn (M) und in der Rattengalle (R) ausgeschieden werden

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Eindampfen:	Rotationsverdampfer, Büchi, Flawil (Schweiz)
HPLC:	Altex Modell 110 A - Pumpe, Beckman Instruments GmbH, München
	Säule: 250 x 4,5 mm, Macherey-Nagel, Düren
	Probenaufgabeventil Rheodyne 70-10 mit 20 µl bzw. 100 µl Probenschleife, Latek, Heidelberg
	Kontron Spektrophotometer Uvikon 720 LC mit Kontron Uvikon Recorder 21
für Aminosäuren-Nachweis:	Fluoreszenz Detektor Labotron FFM 32 (Filter 365 nm)
Photometrische Messungen:	
klare Lösungen:	Zeiss PMQ II Spektralphotometer, Carl Zeiss, Oberkochen
	Kontron Spektrophotometer Uvikon 720 LC mit Kontron Uvikon Recorder 21
Mikrosomensuspension:	Leitz Unicam Sp 800, UV-Spektralphotometer
pH-Meter:	Knick, Bachofer Laboratoriumsgeräte Reutlingen
Radioaktivitätszählung:	Liquid Scintillation System Tri-carb 2660 Packard

Radiochromatographie:	DC-Scanner II LB 2723 Berthold mit Ratemeter-Integrator LB 241 K Berthold, Wildbad
Schüttler:	Vortex-Genie, Bender und Holbein AG, Zürich (Schweiz)
	Super-Mixer, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Ultraschallgerät:	Sonorex TK 52 Transistor, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Zentrifugation:	Christ Laborzentrifuge,HC 162 Labofuge III
	Sorvall-Kühlzentrifuge
	Spinco-Ultrazentrifuge, Modell L
	Ultrazentrifuge Microfuge B, Beckman Instruments GmbH, München

2.2. Chromatographie-Material

DC-Fließmittel:	A_1	Benzol/tert. Butylmethyläther/ 25 % Ammoniak (in Rinne) 15 : 5 : 3
	A_2	Benzol/tert. Butylmethyläther/ 25 % Ammoniak (in Rinne) 20 : 4 : 3
	B	Aceton/Isopropanol/1N Ammoniak 3 : 2 : 0,5
	C_1	Chloroform/Isopropanol/Wasser/ 25 % Ammoniak 13 : 6 : 0,3 : 0,1
	C_2	Chloroform/Isopropanol/Wasser/ 25 % Ammoniak 13 : 9 : 0,4 : 0,1

D_1 Chloroform/Isopropanol/25 % Ammoniak (in Rinne)
20 : 0,5 : 3

D_2 Chloroform/Isopropanol/25 % Ammoniak (in Rinne)
20 : 2 : 3

E n-Butanol/Aceton/25 % Ammoniak/ Wasser
5 : 5 : 1,5 : 0,5

F n-Butanol/Eisessig/Wasser
4 : 1 : 1

G Chloroform/Diisopropyläther/ Isopropanol/ 25 % Ammoniak (in Rinne)
2 : 2 : 0,2 : 2

H Tetrahydrofuran/Hexan/25 % Ammoniak
3,5 : 1,5 : 1 Tropfen

für Aminosäuren-Nachweis:

I Essigester/Isopropanol/25 % Ammoniak
4,5 : 3,5 : 2

J Chloroform/Methanol/Eisessig
20 : 4 : 1

DC-Platten:

Alugram Sil G/UV_{254}, Kieselgel 60 Fertigfolien mit Fluoreszenz-Indikator, 20 x 20 cm, 0,25 mm Schichtdicke, Macherey-Nagel, Düren

DC-Fertigplatten Sil G 200 UV_{254}, Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator, 20 x 20 cm, 2,0 mm Schichtdicke, Macherey-Nagel, Düren

HPLC-Eluens:	Wasser/Methanol/0,1 M Ammonium-acetat-Puffer pH 5 160 : 90 : 40
für Aminosäuren-Nachweis:	Methanol/Wasser/Eisessig/Triäthylamin 42 : 58 : 0,6 : 0,008 Die Eluentien wurden vor Gebrauch 15 min im Ultraschallbad beschallt.
HPLC-Säulenmaterial:	Nucleosil 10 µ C_{18}, Macherey-Nagel, Düren ODS-Hypersil 5 µ, Shandon Southern Products Limited, Astmoor

2.3. Substanzen

Die Substanzen wurden von folgenden Firmen oder Personen zur Verfügung gestellt bzw. bezogen:

^{14}C-AT·HCl	10,6 mg = 75 µCi spezif. Aktivität: 7,08 µCi/mg Markierung an 5,10(11)-C Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway, New Jersey (USA)
^{14}C-AT (Base)	25 mg = 440 µCi spezif. Aktivität: 17,6 µCi/mg Markierung an 3-C der Seitenkette A.Jørgensen, Lundbeck & Co., Kopenhagen (Dänemark)
AT·HCl, NT·HCl	Troponwerke, Köln
E- und Z-10-OH-AT E- und Z-10-OH-NT	A.Jørgensen, Lundbeck & Co., Kopenhagen (Dänemark)

alle übrigen Metaboliten von Amitriptylin	U.Breyer-Pfaff, Tübingen
Clomipramin	Ciba-Geigy, Basel (Schweiz)
^{14}C-Serotonin (als 5-Hydroxytryptamin-kreatinin-sulfatmonohydrat in wäßriger Lösung mit 2 % Äthanol	1 ml = 50 µCi spezif. Aktivität: 143 µCi/mg Markierung an 1-C der Seitenkette Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Amberlite Adsorberharz Typ: XAD-4	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Acetanhydrid	
Acetonitril	
Äthylaminhydrochlorid	E.Merck, Darmstadt
ß-Glucuronidase/Arylsulfatase	Sigma Chemie, München
Diäthanolamin	Fluka Feinchemikalien AG, Neu-Ulm
5-(Dimethylamino-)naphthalinsulfonsäurechlorid (Dansylchlorid)	
EDTA	
KCl	
Li_2CO_3	
Na_2CO_3	
$NaHCO_3$	
Naphthalin	
Naphthalin-diol(1,3)	
NH_4COOCH_3	
Phloroglucin	E.Merck, Darmstadt
POPOP (1,4-bis-2(-5-Phenyloxazolyl)Benzol)	W.Zinsser, Frankfurt

PPO (2,5-Diphenyl-oxazol)	
Propylaminhydrochlorid	E.Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Behringwerke AG, Marburg
Saccharose	
Tris	E.Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Chemie, München
Urethan	E.Merck, Darmstadt
Uridin-5'-diphospho-glucuronat	Sigma Chemie, München

Die organischen Lösungsmittel waren chemisch rein und frisch destilliert.

Szintillator:	Bray-Szintillator, Herstellung: Zu 240 g Naphthalin, 0,8 g POPOP und 1,6 g PPO wurden 400 ml Methanol, 80 ml Äthylenglycol und 3520 ml Dioxan gegeben.
	Unisolve I, W.Zinsser, Frankfurt
Interner ^{14}C-Standard	^{14}C-Kohlenstoff für organische Lösungsmittel, ca. 110 800 dpm (0,05 µCi) pro Kapsel, LKB Wallac Herstellung: Der Inhalt einer Kapsel wurde in 5 ml Bray- bzw. Unisolve-Szintillator gelöst (100 µl = 2216 dpm).

2.4. Untersuchungen mit Rattengalle

2.4.1. Reinigung der Substanzen

2.4.1.1. Reinigung der ^{14}C-Amitriptylin-Lösung

Die Reinheit von ^{14}C-AT·HCl in Benzol wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Je 1 ‰ von 75 µCi ^{14}C-AT-Lösung wurde auf 2 DC-Platten (Alugram Sil G/UV$_{254}$) aufgetragen und in den Fließmitteln A_1 (R_F-Wert von AT: 0,78) und B (R_F-Wert von AT: 0,5) entwickelt.
An Hand des Radiochromatogramms beider Dünnschichtchromatographien konnte festgestellt werden, daß die Substanz nicht rein war (Abb.2a). Daher wurde die gesamte AT-Menge auf 2 DC-Platten aufgetragen (2 x 200 µl) und in dem Fließmittel A_2 (R_F-Wert von AT: 0,68) aufgetrennt. Die AT-Bande, die unter Licht von 254 nm als Hauptbande der UV-absorbierenden Banden zu erkennen war, wurde mit Aqua bidest. besprüht und mit einem Spatel ausgekratzt. Das Kieselgel wurde in einem 15 ml-Zentrifugenglas in 1,5 ml 2 N Ammoniak aufgeschwemmt und das Amitriptylin in 2 ml Chloroform extrahiert. Die Probe wurde 1 min lang geschüttelt und bei 4500 Upm zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert. Dann wurde die Extraktion mit Chloroform noch einmal wiederholt. Die organische Phase wurde in einem 15 ml-Zentrifugenglas vereinigt, an dessen Wand mitgenommene Spuren der wäßrigen Phase hängenblieben. Anschließend wurde die Probe in einem anderen 15 ml-Zentrifugenglas durch Überblasen von Stickstoff bei 30°C eingedampft.
Die Probe wurde in den Fließmitteln B und C_1 (R_F-Wert von AT: 0,5 und 0,91) auf ihre Reinheit überprüft (Abb.2b).
Nun wurde durch Schütteln mit verdünnter Säure der Binder, der aus dem Kieselgel zusammen mit der Substanz herauseluiert wird, entfernt. Es wurde einmal mit 1 ml und zweimal mit 0,5 ml 0,1 N H_2SO_4 je 1 min lang geschüttelt. Im Gegensatz zum Binder löste sich AT in der Säure, so daß die Probe zentrifugiert und abpipettiert werden konnte.

Nach Alkalisieren der sauren Lösung mit einigen Tropfen 25 % igem Ammoniak wurde AT mit Benzol reextrahiert, unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C aufbewahrt.

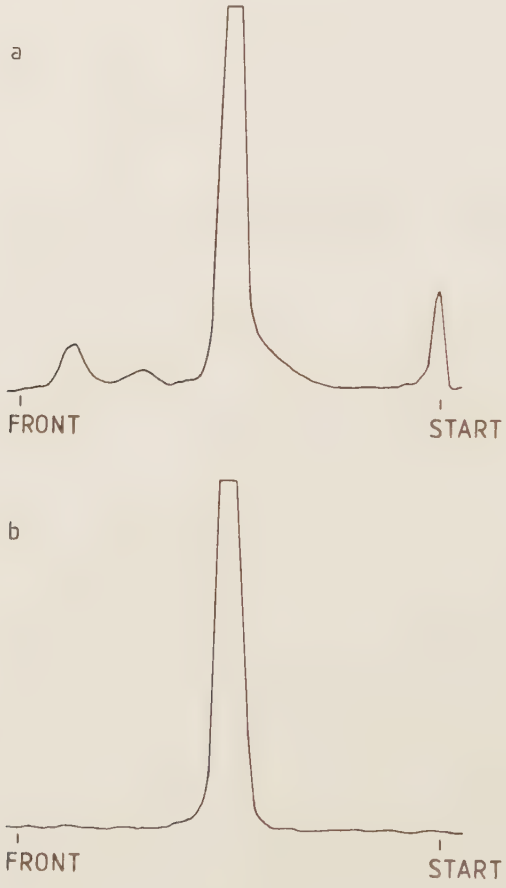


Abb.2: Radiochromatogramm von ^{14}C-Amitriptylin nach Dünnschichtchromatographie in Fließmittel B. a) vor und b) nach der Reinigung.

2.4.1.2. Reinheit des unmarkierten Amitriptylins

Das nicht radioaktiv markierte Amitriptylin, das in den gleichen Fließmitteln wie die markierte Verbindung auf seine Reinheit überprüft wurde, mußte nicht gereinigt werden.

2.4.1.3. Reinheit von Nortriptylin

Bei Nortriptylin, das unmarkiert verwendet wurde, konnten in den gleichen Fließmitteln wie bei Amitriptylin keine Verunreinigungen festgestellt werden.

2.4.1.4. Reinigung von E- und Z-10-Hydroxy-amitriptylin

E- und Z-10-OH-AT wurden auf zwei verschiedene DC-Platten aufgetragen und in Fließmittel C_2 gereinigt. Von beiden Platten wurde die Hauptbande ausgekratzt, das Kieselgel in 2 N Ammoniak aufgeschwemmt und die Substanzen zweimal mit 2 ml Chloroform extrahiert.
Nach Überprüfung der Reinheit in Fließmittel D_1 wurde mit verdünnter Säure der Binder entfernt und die Substanzen nach der Alkalisierung mit 25 % Ammoniak mit Chloroform reextrahiert, unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.1.5. Reinigung von E- und Z-10-Hydroxy-nortriptylin

Die Reinigung erfolgte im gleichen Fließmittel wie bei 10-OH-AT, die Überprüfung der gereinigten Substanz in Fließmittel D_2.

2.4.1.6. Reinigung von 2-Hydroxy-amitriptylin und 2-Hydroxy-nortriptylin

2-OH-AT wurde in Fließmittel D_1, 2-OH-NT in Fließmittel D_2 gereinigt. Die Überprüfung beider Substanzen nach der Reinigung erfolgte in Fließmittel C_2.

2.4.2. Bestimmung der spezifischen Extinktionsdifferenz

Für die quantitative Bestimmung wurde die spezifische Extinktionsdifferenz herangezogen. Aus der Differenz der bei 240 nm und 260 nm bzw. bei 250 nm und 280 nm ermittelten Extinktionen einer in 3 ml 0,1 N H_2SO_4 gelösten Probe und der für 1 µmol/3 ml 0,1 N H_2SO_4 bekannten Extinktionsdifferenz wurde die genaue Menge der Substanz berechnet.
Die zur Auswertung benutzten Wellenlängen und die spezifischen Extinktionsdifferenzen gehen aus Tabelle 1 hervor (Breyer-Pfaff, persönliche Mitteilung).

Tab.1: Zur Auswertung herangezogene Extinktionsdifferenzen der Substanzen bei Messung in 3 ml 0,1 N H_2SO_4

Substanzen	$\lambda_1 - \lambda_2$ (nm)	ΔE für 1 µmol/3 ml
AT, NT	240 - 260	3,5
10-OH-AT (-NT)	240 - 260	3,4
2-OH-AT (-NT)	250 - 280	3,1

Wegen der Ähnlichkeit des Spektrums von E-10-OH-AT (-NT) mit dem von Z-10-OH-AT (-NT) wurde angenommen, daß auch die molaren Extinktionen gleich sind.

2.4.3. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Um eine quantitative Auswertung der Metaboliten zu ermöglichen, wurde die spezifische Radioaktivität der hergestellten Lösung bestimmt. Dazu wurde von einem Aliquot der Lösung die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler ermittelt und parallel dazu die genaue Menge der Substanz in nmol photometrisch bestimmt (s.2.4.2.). Daraus konnte dann errechnet werden, wieviel dpm/nmol die hergestellte Lösung enthielt.

2.4.4. Dosierung

Für die Gallenfistel wurden 6 µCi AT pro Ratte verwendet. Das gereinigte ^{14}C-AT wurde in einem definierten Volumen Benzol gelöst, ein entsprechendes Aliquot entnommen und unter Stickstoff eingedampft. Nach Lösen der Base in der berechneten Menge 0,1 N HCl wurde unmarkiertes AT·HCl dazugegeben und mit 0,9 % iger Kochsalzlösung auf 0,7 g aufgefüllt. Jede Ratte bekam 20 mg/kg AT berechnet als Base verabreicht.
Bei späteren Aufarbeitungen wurden unmarkierte Substanzen verwendet. Die Dosierung betrug jeweils 20 mg/kg Körpergewicht.

2.4.5. Radioaktivitätszählung

Bei jedem Aufarbeitungsschritt der radioaktiv markierten Galle wurde der Lösung ein entsprechendes Aliquot entnommen und die dpm in einem Flüssigszintillationszähler ermittelt. Dadurch wurde eine Kontrolle der durch die Aufarbeitung bedingten Verluste ermöglicht.
Nach Zugabe von 100 µl des Internen ^{14}C-Standards zu einer gezählten Probe konnte durch nochmaliges Zählen der Probe die Zählausbeute ermittelt werden.
Als Szintillator wurde zunächst selbst hergestellter Bray-Szintillator verwendet. Wegen der häufig schwankenden und schlechten Zählausbeuten wurde bei späteren Aufarbeitungen Unisolve I - Szintillator eingesetzt.

2.4.6. Gewinnung von Rattengalle

Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 300 - 380 g verwendet. Sie erhielten Labor-Standard-Futter (Altromin R, Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde 12 Stunden vor dem Versuch entzogen.

Unter Urethannarkose (Urethanlösung 20 Gew.% 4,5 ml/kg, i.p.) wurde direkt unterhalb des Xiphoids das Abdomen 2 cm aufgeschnitten und das Duodenum leicht herausgezogen. In das Gewebe ober- und unterhalb des Gallenganges wurde ein 1 cm langer Schnitt gemacht und der so freigelegte Abschnitt des Gallenganges auf einem dickeren Papierstreifen fixiert. Das den Gallengang umgebende Gewebe wurde mit einer Pinzette abgezupft. Nun wurde der Gallengang angeschlungen, am distalen Ende abgebunden und angeschnitten, ein Teflonschlauch (ca. 0,6 mm ID) eingeführt und festgebunden. Die Operationswunde wurde mit Zellstofftupfern, die mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet waren, abgedeckt. Die Körpertemperatur der Tiere wurde mit einem thermostatisierten OP-Tisch und einer Lampe auf 36,5°C - 37,5°C gehalten.
Nachdem die Gallenfistel gelegt war, wurde die entsprechende Lösung (AT, NT, E- oder Z-10-OH-AT, E- oder Z-10-OH-NT) mit einer Sonde im Bauchraum der Ratte verteilt. Die Galle wurde mit Hilfe des Teflonschlauches in einem Zentrifugenglas 8 Stunden lang gesammelt und dann bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7. Aufarbeitung der enzymatisch dekonjugierten Galle

2.4.7.1. Inkubation

Bei der ursprünglichen Gallenaufarbeitung wurde nach Sammeln der Galle zunächst bei pH 5,5 mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (1,6 U pro Stunde gesammelter Galle, das sind 12,8 U für die in 8 Stunden gesammelte Galle) 24 Stunden bei 37°C inkubiert.
Anfangs wurde dazu ein wenig reines Enzym aus Helix pomatia verwendet, jedoch tauchten Beimengungen des Enzyms in der Fraktion polarer Metaboliten auf und störten die chromatographische Reinigung. Durch Gelfiltration über Sephadex G 100 gelang es, störende Substanzen aus diesem Enzym zu entfernen. Nach der Reinigung wurde das Enzym lyophilisiert. Da der Verlust der Enzymaktivität gleich nach der Gefrier-

trocknung bereits 57 % und nach einer Aufbewahrungszeit von 4 Wochen bei -80°C schon 70 % betrug, wurde bei den späteren Inkubationen eine gereinigtere Form von ß-Glucuronidase/Arylsulfatase aus Helix pomatia verwendet.

2.4.7.2. Extraktion der freigesetzten Alkohole und Phenole

Nach der Inkubation wurden die Proben bei pH 9 zweimal mit 2 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phase, die die aus konjugierten Metaboliten freigesetzten Alkohole und Phenole enthielt, wurde nach der Zentrifugation mit einer Pasteurpipette abpipettiert, unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7.3. Nicht-extrahierbare Fraktion

Die wäßrige Phase, die die nicht-extrahierbare Fraktion enthielt, wurde weiter aufgearbeitet. Nach der Proteinfällung mit 2 N $HClO_4$ wurde das überschüssige Perchlorat mit 1 M K_2CO_3 entfernt. Die sauren Verbindungen wurden bei pH 3 dreimal mit 2 ml Essigester extrahiert, die Essigester-Phase nach der Zentrifugation abpipettiert, unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7.4. Nicht-saure Fraktion

Die nicht-saure Fraktion wurde bei pH 6 auf eine mit Adsorberharz Amberlite XAD-4 gefüllte Glassäule (30 cm lang, 1 cm ID, 25 cm Füllhöhe) gegeben, mit Aqua bidest. gründlich nachgewaschen und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde bei einer Wasserbadtemperatur von ca. 37°C und bei vermindertem Druck im Wasserstrahlvakuum am Rotationsverdampfer in einem Rundkolben eingedampft, dann wieder in einem kleinen Volumen Methanol gelöst, in ein 20 ml Schliffglas überführt und auf ein Volumen von ca. 200 µl eingeengt.

2.4.7.5. Behandlung von Metabolitenfraktionen mit Diazomethan

Bei einem der Vorversuche wurde die mit Methanol von XAD-4 eluierte Fraktion im 20 ml-Schliffglas zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol gelöst und die Lösung in 2 gleiche Teile geteilt.
Die eine Hälfte (1 ml) wurde mit ca. 1 ml Diazomethan (0,2 M) im Überschuß versetzt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Beide Lösungen wurden anschließend unter Stickstoff eingedampft. Der methylierte und der nicht methylierte Teil wurden in je 1 ml Aqua bidest. gelöst und mit 1 N Ammoniak auf pH 9 eingestellt.
Danach wurden die Lösungen zunächst mit Chloroform und anschließend mit Essigester extrahiert. Von allen Fraktionen wurden Aliquots zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen.
Die Extrakte und die wäßrigen Phasen des methylierten und des nicht methylierten Teils der Galle wurden nun wie die XAD-4-Methanoleluate von anderen Gallenaufarbeitungen dünnschichtchromatographisch gereinigt.

2.4.7.6. Dünnschichtchromatographische Trennung

Das Methanoleluat wurde mit Blutzuckerpipetten (Brand, Wertheim) strichförmig auf DC-Folien (Alugram Sil G/UV_{254}-Fertigfolien mit 0,25 mm Schichtdicke) aufgetragen.
Zur Entfernung der Lipide wurden die Folien in dem Fließmittel Chloroform/Essigester/Eisessig (6 : 6 : 0,6) bis zu einer Höhe von 14 cm über der Startlinie vorgewaschen. Nach 10-minütigem Trocknen wurden die Platten zur ersten Trennung der Metaboliten in eine DC-Kammer mit dem Fließmittel n-Butanol/Aceton/25 % Ammoniak/Wasser (5 : 5 : 2,5 : 1) gestellt und zu einer Höhe von 12 cm über der Startlinie entwickelt.

Die Platten wurden im Abzug getrocknet, und die UV-absorbierenden Banden wurden unter Licht von 254 nm markiert. Bei der Aufarbeitung radioaktiv markierter Metaboliten wurde ein Radiochromatogramm gemacht.
Nach Besprühen der Platten mit Aqua bidest. konnte das Kieselgel der Banden mit einem Spatel abgehoben und in einem 15 ml-Zentrifugenglas in 3 ml Methanol aufgeschwemmt werden. Die Proben wurden dreimal 1 min lang in Abständen von 10 min geschüttelt und dann zentrifugiert. Das Methanol wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert, das Kieselgel wieder in Methanol aufgeschwemmt und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Über die Kontrolle der Radioaktivitätszählung konnte festgestellt werden, daß eine dritte Extraktion mit Methanol noch eine Erhöhung der Ausbeute bis zu 10 % erbrachte. Die Methanoleluate wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingedampft.
Die Eluate der einzelnen Fraktionen wurden wieder in Methanol gelöst und auf DC-Folien aufgetragen. Die zweite Trennung der Metabolitengemische erfolgte in dem Fließmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1), die Elution der aufgetrennten Fraktionen wie oben beschrieben.

2.4.7.7. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Reinigung der Metabolitengemische erfolgte auf reverser Phase (Nucleosil 10 µ C_{18}, Macherey-Nagel, Düren). Als mobile Phase wurden verschiedene Eluentien getestet. Eine Mischung aus Wasser/Methanol/25 % Ammoniak unterschiedlicher Zusammensetzungen erwies sich in allen Fällen als zu basisch; verschiedene Zusammensetzungen aus Wasser/Methanol/Eisessig mit bzw. ohne Zusatz von 0,1 M Ammoniumacetatlösung pH 5 schienen zu sauer zu sein. In beiden Fällen wurde das Füllmaterial der Säule geschädigt und löste sich zum Teil auf. Auch die Gradientenprogramme, die ausprobiert wurden, bewährten sich nicht.
Als günstig zeigte sich schließlich eine Mischung von Wasser/Methanol/0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 (160 : 90 : 40), die dann ausschließlich als mobile Phase verwendet wurde.

2.4.8. Aufarbeitung der nicht dekonjugierten Galle

2.4.8.1. Vorreinigung über Amberlite XAD-4

Die Galle wurde mit 1 N Essigsäure auf pH 6 eingestellt und auf die mit Amberlite XAD-4 gefüllte Glassäule gegeben (s. 2.4.7.4.). Nach dem Waschen mit Aqua bidest. wurde mit Methanol eluiert und diese Fraktion am Rotationsverdampfer eingedampft.

2.4.8.2. Extrahierbare Fraktion

Der Verdampfungsrückstand des Methanoleluats wurde in Aqua bidest. gelöst und in ein 20 ml-Schliffglas überführt. Unpolare basische Verbindungen wurden bei pH 9, saure bei pH 3 jeweils dreimal mit 2 ml Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen wurden nach der Zentrifugation abpipettiert, unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C aufbewahrt.
Die Verdampfungsrückstände enthielten die nicht-konjugierten Metaboliten und körpereigene Substanzen (Gallenfarbstoffe, Gallensäuren etc.).

2.4.8.3. Nicht-extrahierbare Fraktion

Die wäßrige Phase wurde wieder auf pH 6 eingestellt und noch einmal auf Amberlite XAD-4 gegeben. Es wurde wieder mit Methanol eluiert und das Eluat unter Vakuum eingedampft. Der Verdampfungsrückstand enthielt die konjugierten Metaboliten.

2.4.8.4. Dünnschichtchromatographische Trennung

Das Eluat wurde in Methanol gelöst und auf DC-Platten aufgetragen. Da es sich als ungünstig erwies, für die Vortrennung ein saures und zur Trennung ein basisches Fließmittel

zu verwenden (s. 2.4.7.6.), wurde die Folie zur Entfernung der Lipide in Chloroform/Isopropanol (20 : 4) vorgewaschen. Dann wurde sie 10 min getrocknet und in eine Kammer mit Fließmittel E gestellt. Nach der ersten Trennung der Metaboliten wurde die Folie nach 30-minütigem Trochnen zur besseren Abtrennung der einzelnen Banden noch einmal im gleichen Fließmittel entwickelt.
Nachdem die Folie getrocknet war, wurden die aufgetrennten Fraktionen mit Methanol eluiert. Die am Rotationsverdampfer auf wenige µl eingeengten Eluate der einzelnen Fraktionen wurden wieder auf eine DC-Folie aufgetragen und zweimal in Fließmittel F entwickelt.

2.4.8.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Unter Verwendung von Wasser/Methanol/0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 (160 : 90 : 40) als mobile Phase wurden die Metabolitengemische auf reverser Phase gereinigt. Ursprünglich wurde dazu Nucleosil 10 µ C_{18} verwendet. Mit ODS-Hypersil 5 µ konnte aber die Reinigung und Auftrennung der Metaboliten noch verbessert werden. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Gewinnung quantitativer Daten:
Durch Berechnung der Peakfläche radioaktiv markierter Glucuronide konnte ermittelt werden, welche Peakfläche einer bestimmten dpm-Zahl und damit einer definierten Substanzmenge entspricht. So wurde es möglich, bei nicht markierten Glucuroniden über die Peakfläche die Substanzmenge annähernd zu bestimmen.

2.4.9. Vergleichende Aufarbeitung von enzymatisch dekonjugierter und nicht dekonjugierter Galle

Die Galle wurde vor der Aufarbeitung in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert, die andere Hälfte nicht. Nach der Inkubation

wurde die inkubierte und die nicht inkubierte Fraktion bei pH 9 mit Chloroform zweimal extrahiert.
Die weitere Aufarbeitung sowohl der inkubierten als auch der nicht inkubierten Galle erfolgte nach dem Aufarbeitungsschema der nicht dekonjugierten Galle (s.2.4.8.).

2.4.10. Identifizierung der Metaboliten

2.4.10.1. Hydrolytische Spaltungen

Da bei der Hydrolyse mit 1 N HCl und einer Inkubation von 1 bzw. 2 Stunden bei 37°C die alkoholischen Metaboliten teilweise dehydratisiert wurden, wurde zur Identifizierung der Aglyka enzymatisch hydrolysiert.

2.4.10.1.1. Enzymatische Hydrolyse

10 - 20 µg des Glucuronids wurden mit 5 mg ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (19 U/g, das sind 0,095 U/5 mg) versetzt und in 1 ml 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 gelöst.
Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C wurde das freigesetzte Aglykon mit 0,5 ml 2 N Ammoniak alkalisiert und mit Chloroform extrahiert.

2.4.10.1.2. Saure Hydrolyse

Spaltung der Glucuronide

10 - 20 µg des Glucuronids wurden mit 200 µl 3 N HCl versetzt und 1 Stunde lang bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurde die Salzsäure unter Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Der Verdampfungsrückstand enthielt die Zersetzungsprodukte der freigesetzten Glucuronsäure und das - meist dehydratisierte - Aglykon.
Freie Glucuronsäure wurde ebenfalls 1 Stunde bei 100°C mit 3 N HCl behandelt und diente als Vergleichssubstanz.

Spaltung von Glutathion

Um evtl. vorhandene Glutathionkonjugate nachzuweisen, wurden einige der durch HPLC isolierten Gallenfraktionen, Glutathion (reduzierte Form), die in Glutathion vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und ein Gemisch dieser 3 Aminosäuren in Methanol gelöst, in dickwandige konische Glasgefäße mit Schraubverschluß und Teflon-Dichtscheibe pipettiert und das Methanol unter Stickstoff entfernt. Die Rückstände wurden danach in 200 µl 6 N HCl gelöst und bei 110°C in einem Thermoblock über Nacht hydrolysiert.
200 µl 6 N HCl wurden zum Vergleich ohne Zusatz eines Stoffes den gleichen Bedingungen ausgesetzt.

2.4.10.2. Dünnschichtchromatographische Trennung und R_F-Werte

2.4.10.2.1. Nachweis der Aglyka

Die mit Chloroform extrahierten Aglyka wurden in Chloroform gelöst und mit Kapillarpipetten (Brand, Wertheim) punktförmig auf DC-Folien (10 x 10 cm, Laufstrecke 7 cm) aufgetragen.
Als Vergleichssubstanzen wurden synthetische bzw. aus Rattengalle gewonnene Metaboliten mitlaufen gelassen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in den Fließmitteln C_2, D_1 und D_2 entwickelt. Die R_F-Werte sind in Tabelle 7 (s. 3.4.1.) zusammengefaßt.

2.4.10.2.2. Nachweis der Glucuronsäure

Die Verdampfungsrückstände wurden in Methanol gelöst und punktförmig auf DC-Folien aufgetragen. Die Chromatogramme wurden in Fließmittel F entwickelt, die Glucuronsäure durch Besprühen mit Naphthoresorcin-Reagenz und anschließendem

5-minütigem Erhitzen des Chromatogramms auf 100°C sichtbar gemacht.
Die Aglyka, die in diesem Fließmittel weiter liefen als die Glucuronsäure, störten bei dieser Bestimmung nicht.

2.4.10.2.3. Versuch des Nachweises von Aminosäuren

2.4.10.2.3.1. Dansylierung von Aminosäuren

Nach der Hydrolyse wurden die Lösungen in ein 10 ml-Schliffglas pipettiert und die Salzsäure am Rotationsverdampfer entfernt. Die Dansylierung erfolgte nach einem Verfahren von Tapuhi et al., 1981.
Die Verdampfungsrückstände wurden in 100 µl 40 mM Li_2CO_3-Puffer pH 9,5 gelöst. Dann wurden 100 µl Dansylchlorid (5-Dimethylamino-naphthalinsulfonsäurechlorid in Acetonitril 1,5 mg/ml bzw. 5,56 mM) zugegeben. Anschließend wurden die Gefäße 2 min mit der Hand leicht geschüttelt, da beim Schütteln mit dem Schüttler sich die Ausbeute verringerte, und 35 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Reaktion mit 10 µl Äthylaminhydrochlorid-Lösung 2 % gestoppt. Nachdem sich die Reaktionslösung entfärbt hatte, wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft.
Bei der Verwendung von Li_2CO_3-Puffer pH 10,5 bzw. Na_2CO_3-Puffer pH 10,5 war die Ausbeute an dansylierten Aminosäuren geringer.
Zum Abstoppen der Reaktion wurde auch Propylaminhydrochlorid-Lösung 2 % ausprobiert, damit sicher war, daß das bei der Reaktion entstandene Dansyläthylamid bei der HPLC keine Substanz überlagert hatte. Dansylpropylamid hat eine wesentlich höhere Retentionszeit als Dansyläthylamid.

2.4.10.2.3.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von dansylierten Aminosäuren

Die dansylierten HPLC-Fraktionen und 0,2 nmol der dansylierten Aminosäuren wurden auf DC-Folien (Alugram Sil G/UV_{254}, 10 x 10 cm) aufgetragen. Die Chromatogramme wurden bis zu einer Höhe von 6 cm in Fließmittel I entwickelt und 10 min bei 110°C im Trockenschrank zwischengetrocknet. Anschließend wurden die Chromatogramme um 90° gedreht und in der 2. Richtung in Fließmittel J wieder bis zu einer Höhe von 6 cm entwickelt (nach Seiler et al., 1964; Pataki, 1966; s. Abb.7, 3.3.3.). Die Detektion erfolgte mit Licht von 365 nm bei noch feuchtem Chromatogramm. Die R_F-Werte sind in Tabelle 6 (3.3.3.) aufgeführt.
Die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Aminosäuren und ein leerer Fleck in entsprechender Größe wurden nach Besprühen mit Aqua bidest. mit einem Spatel ausgekratzt und mit Methanol/25 % Ammoniak (95 : 5) eluiert. Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer eingedampft.

2.4.10.2.3.3. HPLC der dansylierten Aminosäuren

Die eingedampften Rückstände wurden in 40 µl 40 mM Li_2CO_3-Puffer pH 9,5 gelöst. Die Hälfte wurde eingespritzt.
Als Füllmaterial der Säule wurde Nucleosil 10 µ C_{18} und als mobile Phase eine Mischung von Methanol/Wasser/Triäthylamin (42 : 58 : 0,6 : 0,008) verwendet (nach Tapuhi et al., 1981). Die Fließgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 6 (3.3.3.) aufgeführt.

2.4.10.3. Farbreaktionen auf dem Chromatogramm

2.4.10.3.1. Farbreaktionen zum Aglykon-Nachweis

Phenothiazin-Reagenz:
Substituenten im tricyclischen System führen zu unterschiedlichen Färbungen, wenn das Chromatogramm nach Besprühen mit

dem folgenden Reagenz 5 min auf 100°C erhitzt wird:

$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,8 g
H_2O	10 ml
H_2SO_4	10 ml
Äthanol	60 ml

Ninhydrin-Reagenz:
N-Demethylierungen erkennt man an violetten bzw. orangefarbenen Flecken, wenn man das Chromatogramm mit folgendem Reagenz besprüht und anschließend erhitzt:

Ninhydrin	150 mg
Eisessig	1,5 ml
n-Butanol	50 ml

2.4.10.3.2. Farbreaktionen zum Glucuronsäure-Nachweis

Randerath (1965) und Krebs et al. (1967) beschrieben das Naphthoresorcin-Reagenz zum Nachweis von Uronsäuren. Während Randerath nach Pastuska (1961) und Prey et al. (1961) eine 0,2 % ige alkoholische Naphthoresorcin-Lösung mit 20 % iger Schwefelsäure (1 : 1) bzw. mit Orthophosphorsäure (10 : 1) empfahl, schrieben Krebs et al., daß Naphthoresorcin (1,3-Dihydroxy-naphthalin) auch durch Resorcin, Orcin, Phloroglucin oder α-Naphthol zu ersetzen sei und Trichloressigsäure (1 : 1) verwendet werden könne.
Nach Erprobung der verschiedenen Reagentien mit variiertem Säurezusatz fiel die Entscheidung in der vorliegenden Arbeit zugunsten einer 0,2 % igen äthanolischen Phloroglucin-Lösung in Orthophosphorsäure (10 : 1), da die Färbung der Glucuronsäure nach Besprühen mit diesem Reagenz und anschließendem Erhitzen am intensivsten schien. Freie Glucuronsäure färbt sich dann je nach eingesetzter Substanzmenge braunviolett bis rotviolett.

2.4.10.4. Chemische Reaktion

2.4.10.4.1. Acetylierung von Glucuroniden

Durch Acetylierung konnte bei den Glucuroniden von E- und Z-10-Hydroxy-nortriptylin unterschieden werden, ob die Glucuronsäure am Sauerstoff der Hydroxylgruppe oder am Stickstoff der Aminogruppe gebunden war.
Dazu wurden 15 - 20 µg des Glucuronids in 1 ml Aqua bidest. gelöst, eine Spatelspitze $NaHCO_3$ zum Abpuffern der Reaktionslösung und 100 µl Acetanhydrid dazugegeben. Zur Entfernung des überschüssigen Acetanhydrids wurden 50 µl Diäthanolamin zugesetzt.

2.4.10.4.2. Acetylierung der Vergleichssubstanzen

E- und Z-10-Hydroxy-nortriptylin, 10-Hydroxy-didesmethylamitriptylin und Dehydro-nortriptylin, das durch einstündige Behandlung von 10-OH-NT mit 3 N HCl bei 100°C im Wasserbad hergestellt wurde, wurden ebenfalls acetyliert und wie die acetylierten Glucuronide aufgearbeitet. Sie dienten als Vergleichssubstanzen für die DC.
Im Gegensatz zu anderen Acetylierungsverfahren wurden in diesem Fall die Hydroxylgruppen bei der Acetylierung nicht dehydratisiert.

2.4.10.4.3. Enzymatische Hydrolyse der acetylierten Verbindungen

Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 5 eingestellt, 5 mg ß-Glucuronidase/Arylsulfatase dazugegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.4.10.4.4. Extraktion der hydrolysierten Verbindungen

Nach der Inkubation wurde mit 0,5 ml 2 N Ammoniak alkalisiert und Aglyka und Vergleichssubstanzen mit Chloroform extrahiert.

2.4.10.4.5. Dünnschichtchromatographische Trennung

Der Verdampfungsrückstand mit den Aglyka wurde in Chloroform gelöst und auf DC aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen wurden die acetylierte und die nicht acetylierte Form von 10-OH-DM_2-AT, von E- bzw. Z-10-OH-NT und von Dehydro-NT aufgetragen. Die Chromatogramme wurden in den Fließmitteln G und H entwickelt. Die R_F-Werte sind in Tabelle 9 zusammengefaßt, das Dünnschichtchromatogramm ist in Abbildung 8 zu sehen (s. 3.4.3.).

2.4.10.5. Synthese von Glucuroniden

2.4.10.5.1. Präparation von Mikrosomen

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet, ausgeblutet, die Lebern herauspräpariert, gewogen und in eiskalte 0,9 % ige Kochsalzlösung gelegt. Die Lebern wurden mit der Schere zerkleinert und dreimal mit 0,9 % iger Kochsalzlösung und einmal mit Saccharose-Tris-EDTA-Lösung (0,25 M Saccharose, enthaltend 20 mM Tris-HCl und 5,4 mM EDTA-Na_2, pH 7,4 nach Netter, 1960) gewaschen.

Saccharose-Tris-EDTA-Lösung:

85,9 g Saccharose
2,4 g Tris
2,0 g EDTA

wurden in Aqua bidest. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

KCl-Tris-Lösung:
4 Teile einer 1,15 % igen KCl-Lösung wurden mit einem Teil 0,25 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 vermischt.

Je 5 g Lebergewebe wurden mit 28 g Saccharose-Tris-EDTA-Lösung im Potter-Elvehjem homogenisiert.
Das Homogenat wurde 20 min bei 10 000 Upm in einer Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleine Röhrchen verteilt und in einem vorgekühlten Rotor 50 bei 30 000 Upm 90 min in der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen jeder Leber wurden in KCl-Tris-Lösung suspendiert und noch einmal 90 min bei 30 000 Upm ultrazentrifugiert. Die gewaschenen Mikrosomen wurden in ca. 10 ml Saccharose-Tris-EDTA-Lösung homogenisiert und suspendiert, was eine Eiweißkonzentration von ca. 5 mg Protein pro ml Suspension ergab.
Alle Arbeiten wurden im Temperaturbereich von 0° - 4°C ausgeführt.

2.4.10.5.2. Eiweißbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach dem Verfahren von Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin (1 mg/ml) als Standard bestimmt. Bei jeder Eiweißbestimmung wurde erneut eine Eichkurve angefertigt.
Die Mikrosomensuspension wurde mit Aqua bidest. 10- bis 15-fach verdünnt, je Probe wurden 3 Ansätze (mit steigender Proteinmenge) bestimmt.

Ansatz: Mikrosomen-Verdünnung (0,05 - 0,15 mg Protein)
oder Protein-Standard (40 - 140 µl)
und Aqua bidest. ad 0,3 ml
0,3 ml 1 N NaOH
3 ml alkalisches Cu-Reagenz, bestehend aus
100 Teilen 2 % iger Na_2CO_3-Lösung
1 Teil 2,7 % iger K-Na-Tartrat-Lösung
1 Teil 1 % iger $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$-Lösung

10 min stehenlassen
0,3 ml 1 : 1 verdünntes Folin-Ciocalteus-Reagenz
unter Schütteln zugeben, 30 min stehenlassen

Es wurde die Extinktion im sichtbaren Licht (720 nm) photometrisch bestimmt und aus der Eichkurve die Proteinkonzentration der Mikrosomensuspension ermittelt.

2.4.10.5.3. Inkubation mit Lebermikrosomen

Durch Biosynthese der Glucuronide (in Analogie zu einem Verfahren von Bock et al., 1976) aus dem entsprechenden Aglykon und dem Natriumsalz der UDP-Glucuronsäure wurden Referenzsubstanzen hergestellt, deren Retentionszeiten bei der HPLC mit denen der isolierten Metaboliten verglichen wurden.

Inkubationsansatz: 2 mg mikrosomales Protein
20 mM UDP-Glucuronat in Tris-Puffer
0,05 % Triton X-100

Die Mikrosomen, Triton X-100 und das Natriumsalz der UDP-Glucuronsäure gelöst in Tris-Puffer wurden in ein 20 ml-Schliffglas pipettiert. Nach einer Vorinkubation von 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe der entsprechenden Aglykon-Lösung gestartet. Die Konzentration des Aglykon in der Inkubationslösung war 0,5 mM. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zusatz von 0,5 ml 25 % Ammoniak gestoppt.
In Vorversuchen mit ^{14}C-markiertem E-10-OH-AT wurde die Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen, die wäßrige Phase mit 25 % Ammoniak alkalisiert und mit Chloroform extrahiert, um an Hand der umgesetzten Aglykonmenge den Reaktionsverlauf der Inkubation und damit die für eine gute Syntheseausbeute nötige Inkubationsdauer zu bestimmen (Bock et al., 1974).

2.4.10.5.4. Extraktion aus dem Inkubationsgemisch

Der nicht umgesetzte Teil des Aglykon wurde nach der Alkalisierung der Lösung mit 25 % Ammoniak durch Extraktion mit Chloroform wiedergewonnen.

2.4.10.5.5. Reinigung des synthetisierten Glucuronids

Die wäßrige Phase wurde auf XAD-4 gegeben. Der Proteinniederschlag, der im Schliffglas zurückblieb, wurde mit Aqua bidest. gewaschen, zentrifugiert und der Überstand auch auf XAD-4 gegeben. Das synthetisierte Glucuronid wurde mit Methanol eluiert und das Methanoleluat am Rotationsverdampfer auf ca. 100 µl eingeengt.
Anschließend wurde es mit einer Blutzuckerpipette auf eine DC-Folie aufgetragen, in Fließmittel F gereinigt und mit Methanol eluiert. Das Methanoleluat wurde unter Stickstoff eingedampft.

2.4.10.5.6. HPLC der synthetisierten Glucuronide

Mit Wasser/Methanol/0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 (160 : 90 : 40) als mobile Phase und Nucleosil 10 µ C_{18} als Füllmaterial wurde die Retentionszeit der synthetisierten mit derjenigen der isolierten Glucuronide verglichen (s. Tab. 3).

2.4.10.6. UV-Spektrophotometrie

2.4.10.6.1. Messung der Glucuronide

Die UV-Spektren der Glucuronide wurden in 3 ml Methanol gemessen. Zur Alkalisierung wurden 50 µl 25 % Ammoniak in die Küvette pipettiert, die Küvette mit Parafilm verschlossen, umgeschüttelt und erneut das Spektrum gemessen.

2.4.10.6.2. Messung der Aglyka

Hydrolysierte Verbindungen wurden in 3 ml 0,1 N H_2SO_4 gemessen. Anschließend wurde mit 1 ml Dichloräthan geschüttelt und erneut gemessen, um zu prüfen, ob sich die Extinktion vermindert hat; denn saure Metaboliten lassen sich mit Dichloräthan extrahieren. Nach der Messung des Spektrums wurde jeder Küvette 0,1 ml 5 N NaOH zugesetzt und das Spektrum wieder gemessen.

2.4.10.6.3. Rückgewinnung

Bei den Glucuroniden wurde das Methanol durch Überblasen von Stickstoff entfernt. Die Aglyka wurden aus der alkalischen Lösung mit Chloroform reextrahiert.

2.4.10.7. Strukturaufklärung durch FAB-Massenspektrometrie und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen zur Strukturaufklärung der Amitriptylin-Metaboliten durch FAB-Massenspektrometrie und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie wurden in der Abteilung Chemische Forschung der Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, unter Leitung von Prof. Dr. A. Prox durchgeführt.

2.4.10.7.1. FAB-Massenspektrometrie

Die Aufnahme der "Fast Atom Bombardment"-Spektren erfolgte mit einem aufgerüsteten hochauflösenden Massenspektrometer MS 902 (AEI/VG), das an ein Incos-Datensystem 2300 (Finnigan-MAT) angeschlossen war. Bei einer Beschleunigungsspannung von 8 KV betrug der Massenbereich ca. 1700 u. Die Massenspektren wurden bei einer Auflösung von ca. 1000 mit einer Scan-Geschwindigkeit von 10 s/Massendekade aufgenommen. Für die Erzeugung der Ar-Atome wurde eine Saddle Field FAB Source (Fa. Ion Tech. Ltd.) verwendet. Die kinetische Energie betrug 7 - 8 keV bei einem Ionenstrom von 1 - 2 mA.

Zur Aufnahme der FAB-Spektren wurden einige Mikrogramm der Substanzen wahlweise in Methanol, Dimethylsulfoxid oder einem Gemisch aus beiden Lösungsmitteln gelöst und in eine dünne Glycerin-Schicht auf einem ca. 9 mm^2 großen Edelstahlträger gegeben. Dieser Träger wurde über einen Direkteinlaß in die FAB-Ionenquelle (VG Instruments) eingeschleust.

Die hohe Empfindlichkeit und Spezifität der Massenspektrometrie machten sie zu einer der wertvollsten Techniken für die strukturelle Charakterisierung von Glucuroniden (Fenselau und Johnson, 1980). Die Einführung der FAB-MS (Surman und Vickerman, 1981; Barber et al., 1981a, 1981b und 1982) hat viele polare, thermisch labile und ionische Verbindungen der MS zugänglich gemacht.

Bei der FAB-MS wird die zu analysierende Substanz in einem Lösungsmittel mit niedrigem Dampfdruck gelöst und auf eine wenige mm^2 große Metallplatte aufgetragen, die an einer Schubstange befestigt ist. Nach dem Einführen in die Ionenquelle eines Massenspektrometers wird die Probe mit schnellen, neutralen Edelgasatomen (Argon, Xenon) von 3 - 7 keV Energie beschossen. Die infolge des Beschusses aus der Probenlösung austretenden Sekundärionen werden in das Massenspektrometer geleitet und analysiert (Lehman und Fenselau, 1982; Röllgen, 1983). Die FAB-MS ist sehr geeignet für die Analyse von quartären N-Glucuroniden (Lehman und Fenselau, 1982; Lehman et al., 1983).

2.4.10.7.2. ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahmen erfolgten mit einem 400-MHz-Gerät (AM 400, gekoppelt mit ASPET 2000, Bruker) bei Raumtemperatur. Die Substanzen wurden in Deutero-chloroform (Deuterierungsgrad 99,5 %) oder in Deutero-DMSO (Deuterierungsgrad 99,99 %) gelöst, und später wurde Deutero-methanol zugesetzt, um austauschbare H-Atome zu erfassen. Als interner Standard diente Trimethylsilan.

2.5. Untersuchungen mit menschlichem Urin

2.5.1. Versuche mit ^{14}C-markiertem Amitriptylin

2.5.1.1. Reinigung des ^{14}C-markierten Amitriptylins

Von 75 µCi AT·HCl in Festsubstanz wurden 3,2 mg (22,6 µCi) abgewogen und in 1 ml Methanol gelöst. 2 ‰ davon wurden punktförmig auf eine DC-Folie aufgetragen und in Fließmittel A_1 zur Überprüfung der Reinheit entwickelt. Die Reinigung ist unter 2.4.1.1. beschrieben.
Nach der 2. Reinigung der Substanz war im Radiochromatogramm keine Verunreinigung mehr zu sehen.

2.5.1.2. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Die Bestimmung ist unter 2.4.3. beschrieben.

2.5.1.3. Dosierung

Eine weibliche Versuchsperson (44 Jahre) mit einem Körpergewicht von 53 kg, die frei von jeder Medikation war, nahm eine Mischung aus 17,2 µCi ^{14}C-AT und 47,9 mg unmarkiertem AT gelöst in 0,1 N HCl ein.
Bei einer spezifischen Radioaktivität von 214 dpm/nmol betrug die eingenommene AT-Dosis 49 mg.

2.5.1.4. Elimination

Der Urin wurde zunächst im 12 Stunden-Rhythmus, ab dem 7. Tag im 24 Stunden-Rhythmus gesammelt. Aliquots von 0,5 ml oder 1 ml wurden entnommen, und die Radioaktivität wurde gezählt. Der Urin wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2. Untersuchung von Patientenharn

Für die Untersuchungen wurde der Harn einer weiblichen stationären Patientin der Universitäts-Nervenklinik Tübingen (48 Jahre) mit einem Körpergewicht von 80,5 kg verwendet. Sie nahm pro Tag 150 mg Amitriptylin ein. Aufgearbeitet wurde ein 12 Stunden-Urin.
Die zusätzliche Einnahme von täglich 1,5 Tabletten Euglucon N (5,25 mg Glibenclamid) störte bei der Aufarbeitung des gesammelten Urins nicht.

2.5.3. Aufarbeitung des Harns

Die Aufarbeitung ist unter 2.4.8. beschrieben. Sie erfolgte bei dem radioaktiven Urin und dem Patientenharn auf gleiche Weise wie bei der nicht inkubierten Rattengalle. Vor der Aufarbeitung wurde der Urin zentrifugiert und der Niederschlag zweimal mit Aqua bidest. nachgewaschen.

Für die Reinigung über XAD-4 wurde wegen des größeren Volumens des Harns (ca. 500 ml, bei der Rattengalle 5 - 8 g) eine größere Glassäule verwendet (70 cm lang, 1,4 cm ID, 60 cm Füllhöhe).

2.5.4. Vergleichende Aufarbeitung von inkubiertem und nicht inkubiertem Urin

Bei diesem Vergleich wurde der Harn mit radioaktiv markiertem Amitriptylin verwendet. Der Urin von 12 - 24 Stunden wurde nicht, der von 24 - 36 Stunden wurde mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert.
Im Gegensatz zur Rattengalle wurde erst nach der 1. XAD-Reinigung und der Extraktion mit Essigester mit dem Enzym inkubiert.
Nach der Inkubation wurde noch einmal bei pH 9 und bei pH 3 mit Essigester extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte dann wie unter 2.4.8. beschrieben.

2.5.5. Identifizierung der Metaboliten

Die Identifizierung der Metaboliten aus menschlichem Urin erfolgte genauso wie bei der Rattengalle. Zur Durchführung s. 2.4.10.

2.6. Pharmakologische Testung

2.6.1. Prinzip des Tests

Bei dieser Untersuchung wurde die Hemmwirkung von AT, E-10-OH-AT, E-10-OH-NT und E-10-OH-AT-Glucuronid auf die Aufnahme von ^{14}C-Serotonin in menschlichen Thrombozyten ermittelt (Lingjærde, 1979a und 1979b).

2.6.2. Beschreibung des Versuchs

Aus Blutproben von Versuchspersonen wurden durch zweimalige Zentrifugation bei verschiedenen Geschwindigkeiten die Thrombozyten gewonnen und in einer Pufferlösung von definierter Zusammensetzung suspendiert. Dieser Thrombozytensuspension mit eingestelltem Proteingehalt wurden die einzelnen Pharmakalösungen verschiedener Konzentration zugesetzt. Als Kontrolle diente eine Thrombozytensuspension ohne Pharmakonzusatz.

Ein Aliquot der Untersuchungslösung wurde in ein Mikrosedimentationsgefäß pipettiert, das 5 µl Siliconöl enthielt. Bei der Zentrifugation sedimentierten die Thrombozyten durch die Siliconölschicht und ließen sich so vom Überstand trennen. Die Radioaktivität des Sediments und die des Überstandes konnte man getrennt zählen, indem man die Mikrosedimentationsgefäße in Höhe der Siliconölschicht durchschnitt. Diese Methode wurde für Mitochondrien von Werkheiser und Bartley (1957) und von Pfaff (1965) entwickelt.

Nach einer Vorinkubation von 5 min wurde die Inkubation durch Zugabe von ^{14}C-markiertem Serotonin gestartet und nach 1 min durch Zugabe einer Clomipramin-Lösung unter Eiskühlung gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Radioaktivität von Sediment und Überstand ermittelt.

Nähere Einzelheiten dieses Versuches werden in einer künftigen Dissertation von H.-P. Böhne zu finden sein.

2.6.3. Konzentrationen der eingesetzten Lösungen

Für die ^{14}C-Serotonin-Lösung wurde eine Konzentration von 1,0 µM im Ansatz gewählt.
Die Konzentrationen der Pharmakonlösungen unterschieden sich jeweils um eine Zehnerpotenz. Für AT wurden Konzentrationen von 0,005 µM bis 5,0 µM, für E-10-OH-AT von 0,005 µM bis 500 µM, für E-10-OH-NT von 0,05 µM bis 50,0 µM und für E-10-OH-AT-Glucuronid von 0,005 µM bis 50,0 µM eingesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Elimination von ^{14}C-Amitriptylin beim Menschen

Die spezifische Radioaktivität der eingenommenen ^{14}C-AT-Lösung betrug 214 dpm/nmol. Der Urin wurde 8 Tage lang gesammelt. Nach 48 Stunden waren bereits 67 % der Dosis (118,2 µmol von 176,5 µmol), nach 204 Stunden waren 87,6 % der eingenommenen Menge wieder ausgeschieden; das waren 154,6 µmol bzw. 15,04 µCi.
In Tabelle 2 ist die Eliminationskinetik, in Abbildung 3 die kumulative Ausscheidung von ^{14}C-AT zu sehen.

Tab.2: Eliminationskinetik von Amitriptylin nach oraler Einnahme von 49 mg entsprechend 17,2 µCi ^{14}C-AT

Urinprobe	Zeit (h)	Menge (ml)	dpm·10^{-3}	µmol
U 1	0 - 12	500	10 763	50,3
U 2	12 - 24	490	6 875	32,1
U 3	24 - 36	325	4 364	20,4
U 4	36 - 48	443	3 288	15,4
U 5	48 - 60	375	2 094	9,8
U 6	60 - 72	500	1 527	7,1
U 7	72 - 84	320	1 123	5,2
U 8	84 - 96	415	824	3,9
U 9	96 - 108	688	608	2,8
U 10	108 - 120	420	430	2,0
U 11	120 - 132	370	336	1,6
U 12	132 - 144	420	256	1,2
U 13	144 - 156	400	188	0,9
U 14+15	156 - 180	870	264	1,2
U 16+17	180 - 204	805	151	0,7

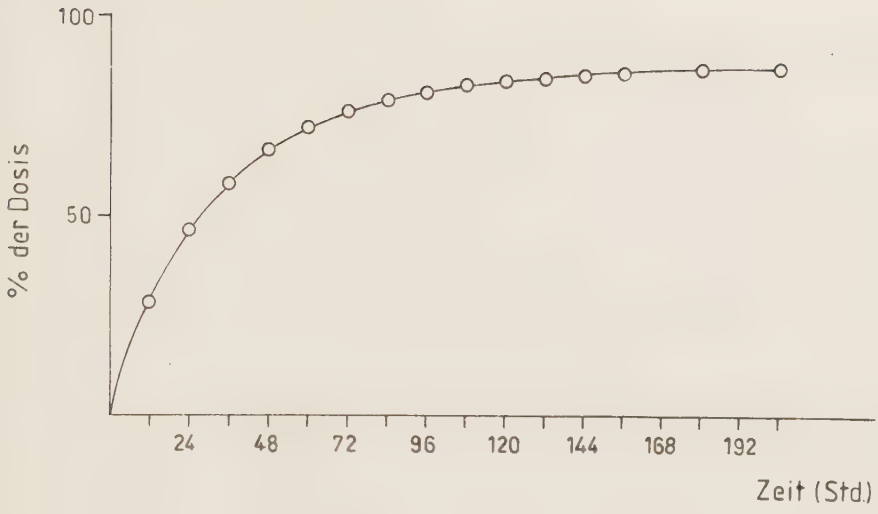


Abb.3: Kumulative Ausscheidung von ^{14}C-AT nach einer Einnahme von 176,5 µmol

3.2. Isolierung und Trennung der Metaboliten aus Rattengalle und Menschenharn

3.2.1. Vorreinigung

Im Gegensatz zu den nicht konjugierten Metaboliten können Glucuronide und Sulfate nicht durch Extraktion aus wäßrigem Milieu angereichert werden, da sie sehr hydrophil sind. Es wurde daher versucht, durch Vorreinigung die nativen Gallen- und Urinbegleitstoffe zu verringern.

Da in Vorversuchen die Enteiweißung mit Perchlorsäure mit großen Verlusten radioaktiver Substanzen verbunden war, erfolgte die Abtrennung der Metaboliten von der Mehrzahl endogener Verbindungen durch Adsorption an dem Polystyrol-Harz Amberlite XAD-4.

Das mit Methanol eluierte Gemisch wurde durch Extraktion mit Essigester von lipophilen Komponenten befreit und durch Dünnschichtchromatographie in 2 Systemen aufgetrennt und

gereinigt. Als letzter Reinigungsschritt wurde dann die Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer reversen Phase eingesetzt.

In Vorversuchen wurde es durch Einsatz von ^{14}C-markiertem Amitriptylin möglich, die Verluste der einzelnen Aufarbeitungsschritte zu quantifizieren (s. Schema 1 - 4).

In Abbildung 4 ist als Beispiel für eine dünnschichtchromatographische Reinigung die DC-Trennung der Galle einer Ratte, die Nortriptylin bekommen hatte, dargestellt.

Aus Bande II.2 wurde 10,11-Dihydroxy-nortriptylin-glucuronid als Diastereomerengemisch isoliert. Die Auftrennung erfolgte erst durch die HPLC. Bande III.2 lieferte ein Gemisch von 10,11-Dihydroxy-nortriptylin-glucuronid und 2-Hydroxy-nortriptylin-glucuronid, während Bande III.3 die Diastereomeren von E-10-Hydroxy-nortriptylin-glucuronid enthielt. Aus Bande IV.1 wurde bei einer Ratte E-10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid gewonnen. In diesem Fall muß also bei der Metabolisierung eine Methylierung stattgefunden haben. Bei der Aufarbeitung von Galle einer anderen Nortriptylin-behandelten Ratte fehlte diese Bande im Dünnschichtchromatogramm, und es konnte kein E-10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid isoliert werden. Aus Bande IV.2 wurde 10-Hydroxy-didesmethyl-amitriptylin-glucuronid isoliert.
Die anderen Banden enthielten keine Nortriptylin-Metaboliten, wie bei der HPLC-Trennung festgestellt wurde.

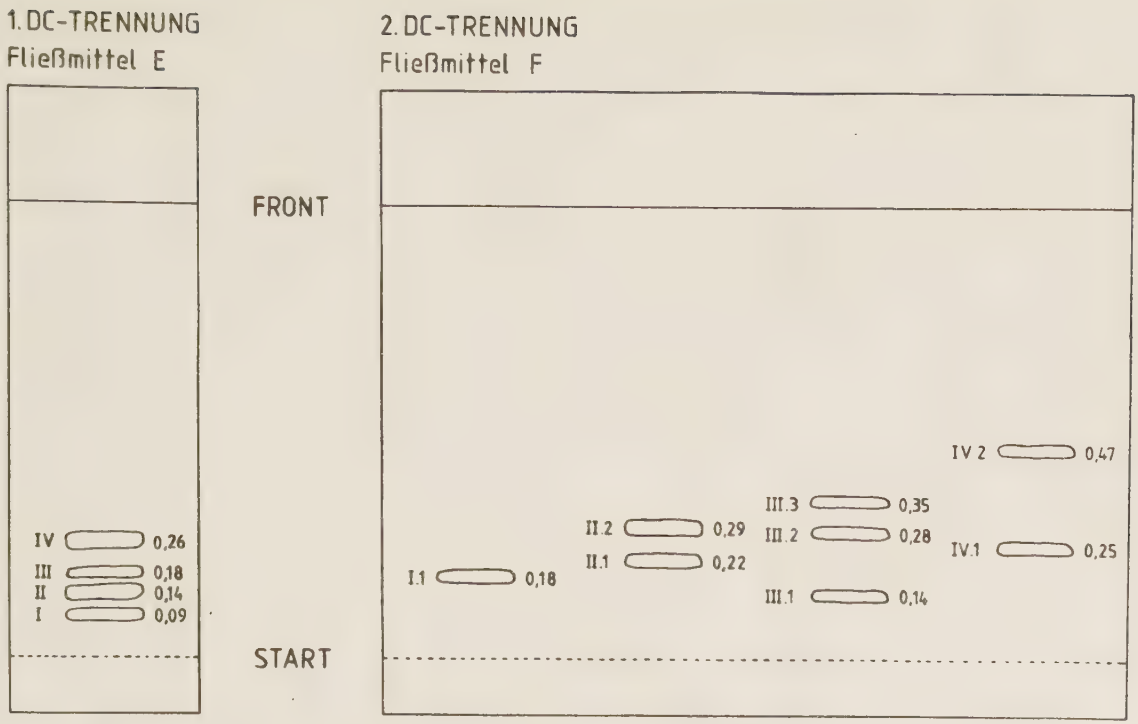
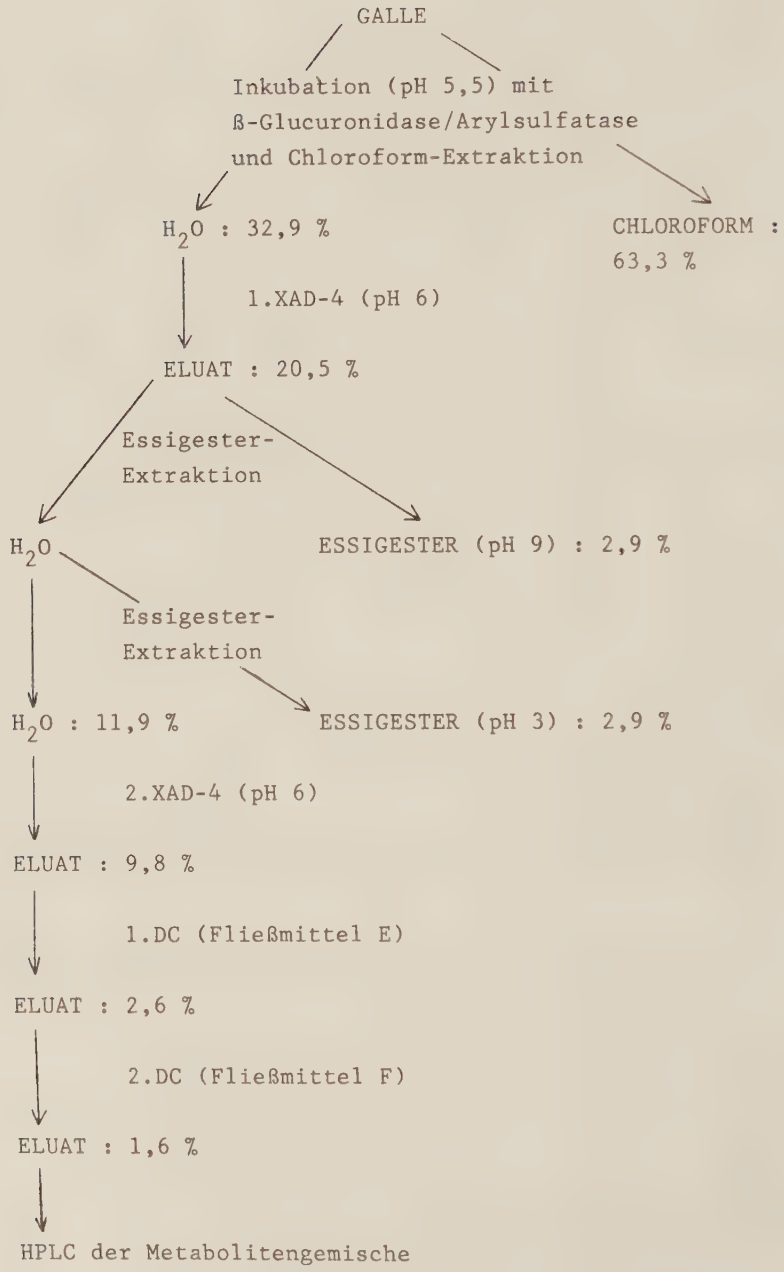
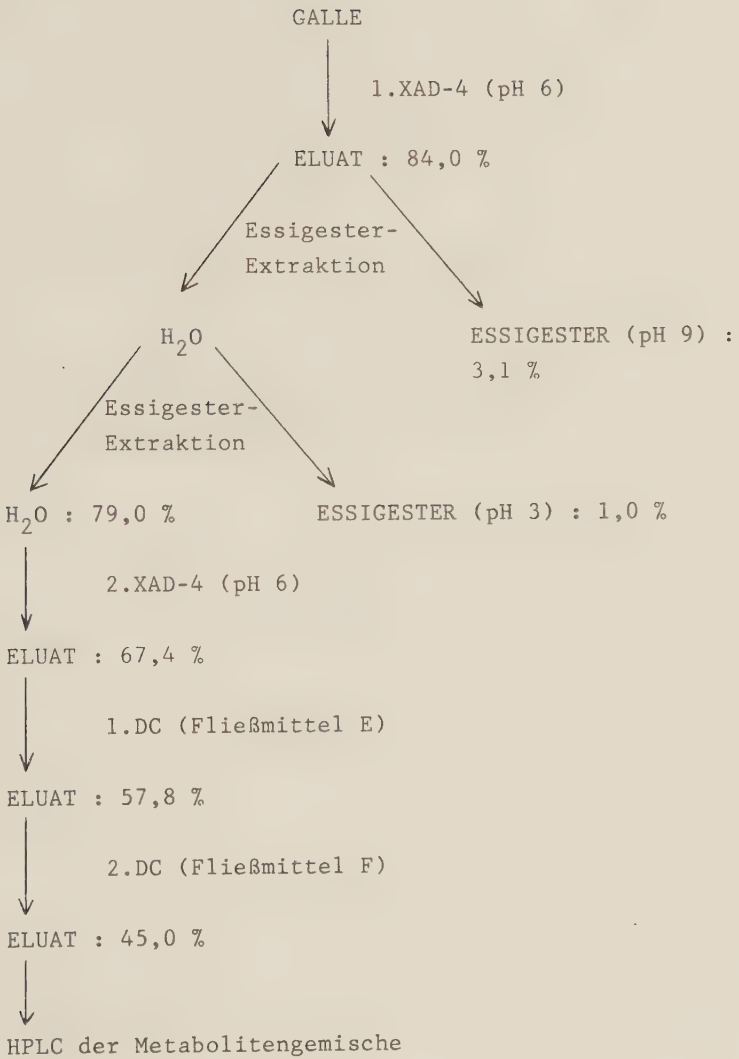


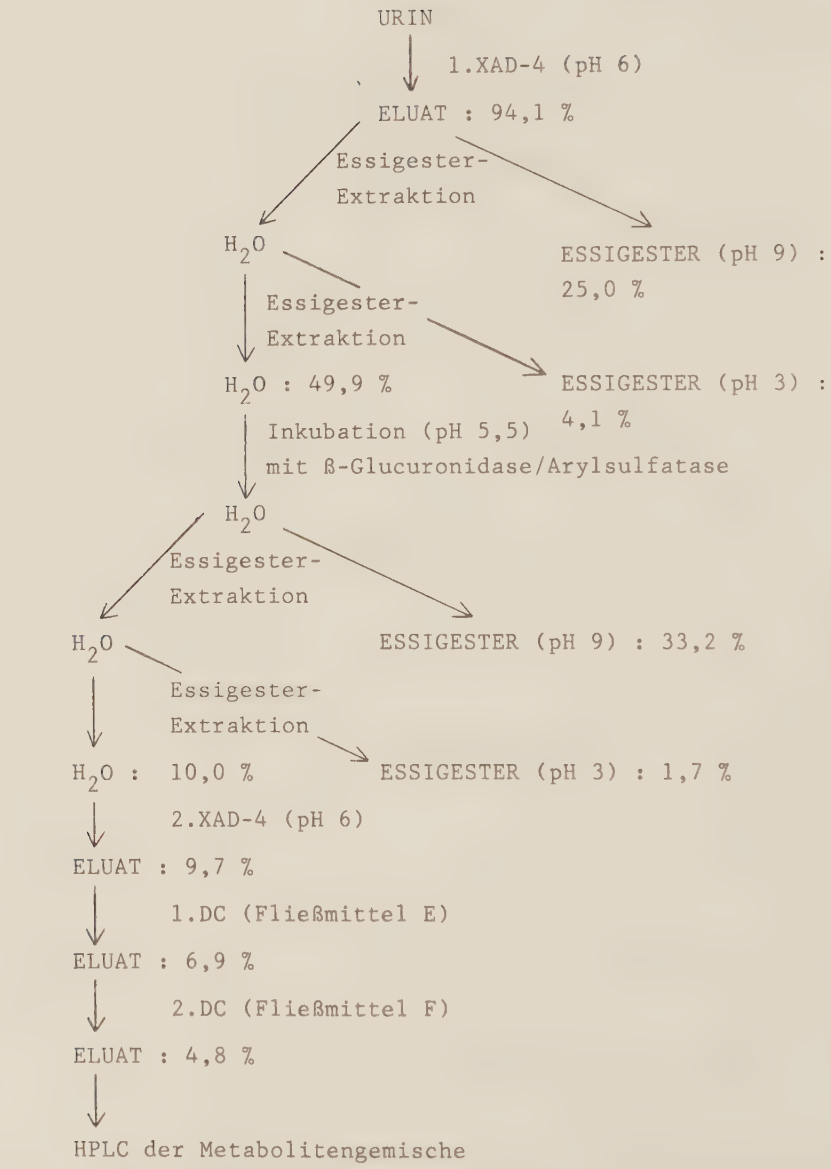
Abb.4: Dünnschichtchromatographische Reinigung von Rattengalle nach Gabe von Nortriptylin



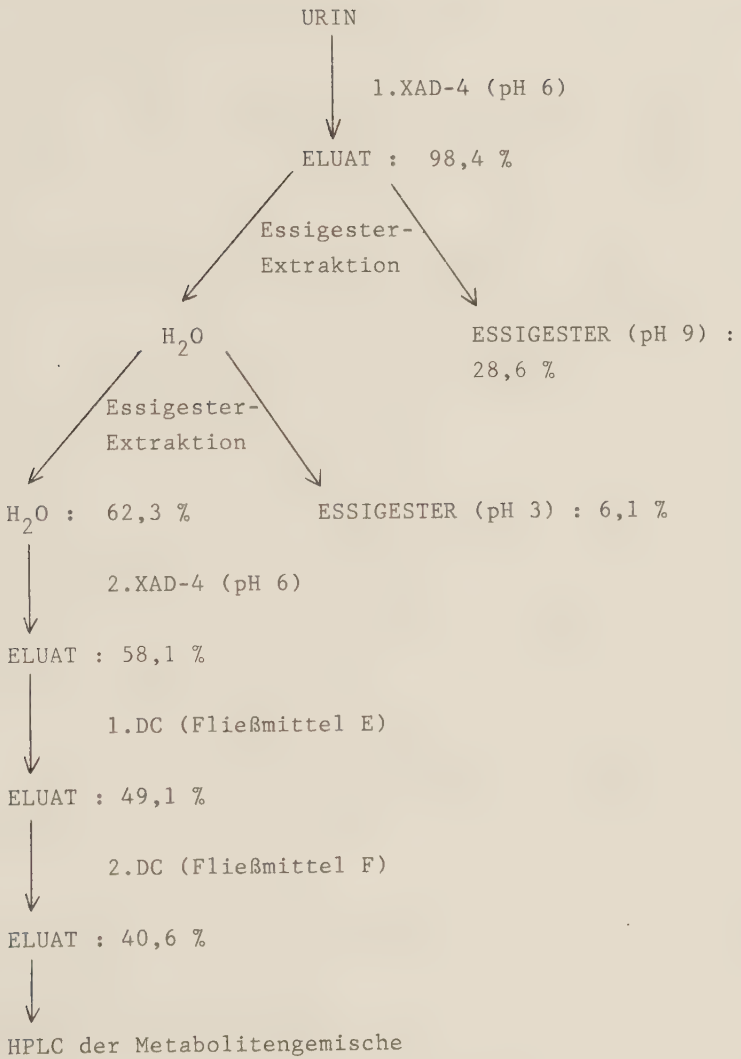
Schema 1: Aufarbeitungsschema von Rattengalle nach Gabe von ^{14}C-Amitriptylin mit enzymatischer Dekonjugation



Schema 2: Aufarbeitungsschema von Rattengalle nach Gabe von ^{14}C-Amitriptylin ohne enzymatische Dekonjugation



Schema 3: Aufarbeitungsschema von menschlichem Urin nach Einnahme von ^{14}C-Amitriptylin mit enzymatischer Dekonjugation



Schema 4 : Aufarbeitungsschema von menschlichem Urin nach Einnahme von ^{14}C-Amitriptylin ohne enzymatische Dekonjugation

3.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die HPLC ermöglichte eine Trennung und Reinigung der durch die DC vorgereinigten Metabolitengemische. Bei der DC wurden aus der 1.Trennung 3 - 4 Fraktionen und aus diesen bei der 2.Trennung zwischen 1 und 4 Banden gewonnen. Man erhielt so ca. 8 - 10 Fraktionen, die nach der Elution mit Methanol auf die HPLC-Säule injiziert wurden. Abbildung 5 zeigt die HPLC-Trennung einer Fraktion aus Galle AT-behandelter Ratten nach dünnschichtchromatographischer Vorreinigung.

Mit Ausnahme von 2-Hydroxy-nortriptylin- und 10,11-Dihydroxy-nortriptylin-glucuronid wurden die Metaboliten bei der HPLC in reiner Form gewonnen. 2-Hydroxy-NT-Glucuronid trennt sich sowohl bei der DC als auch bei der HPLC schlecht von 10,11-Dihydroxy-NT-Glucuronid. Das Gemisch der beiden Glucuronide wurde deshalb nach der HPLC-Reinigung durch mehrfaches Entwickeln in Fließmittel E dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. In Abbildung 6 sind die HPLC-Chromatogramme von 2-Hydroxy-NT- und 10,11-Dihydroxy-NT-Glucuronid nach der Auftrennung durch Fließmittel E zu sehen.

Eine Direktinjektion von XAD-4 gereinigter Galle führte zu keiner Auftrennung von Metabolitenpeaks durch die HPLC-Säule, da das Chromatogramm zu stark durch Verunreinigungen überlagert war.

Die Retentionszeiten der Glucuronide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die isolierten Glucuronide stimmten in ihren Retentionszeiten auf Nucleosil 10 μ C_{18} mit den synthetisierten Glucuroniden überein. Bei späteren Aufarbeitungen wurde wegen der besseren Trennung ODS-Hypersil 5 μ als Füllmaterial verwendet (s. Tabelle 4).

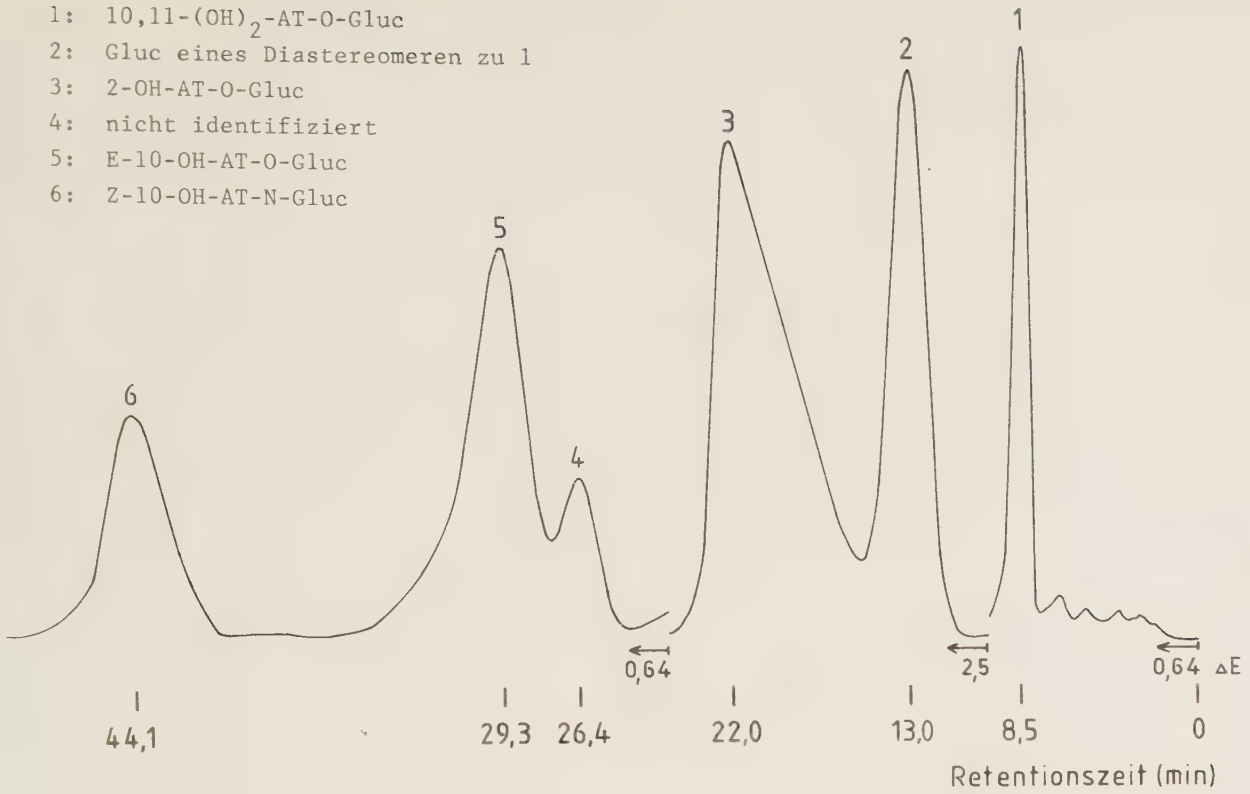


Abb.5: HPLC-Trennung einer Fraktion aus Galle AT-behandelter Ratten nach dünnschichtchromatographischer Vorreinigung

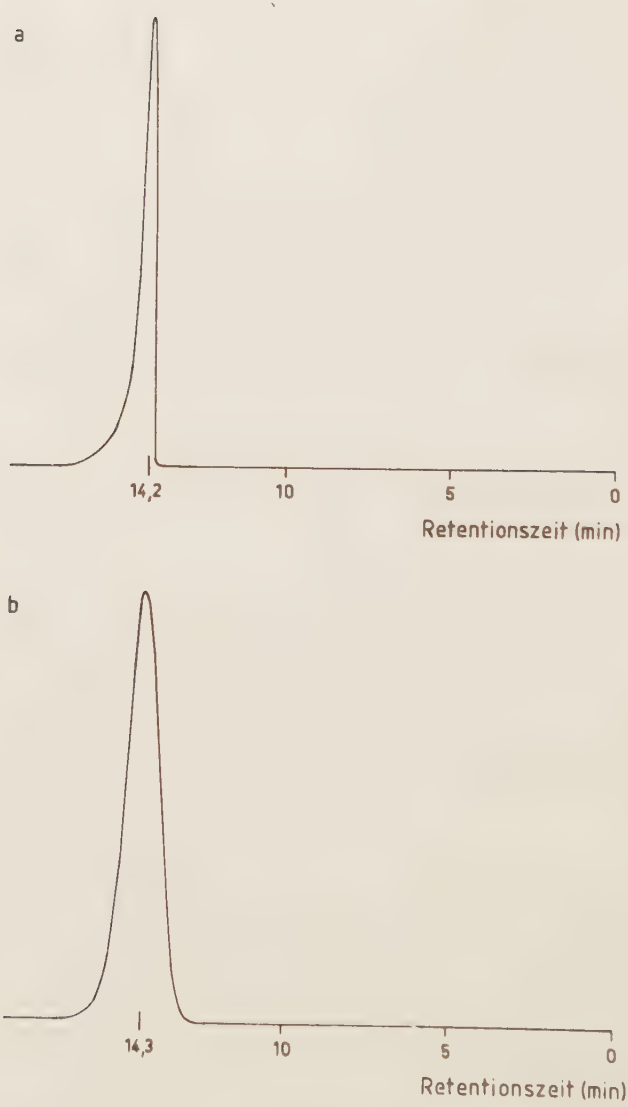


Abb.6: HPLC-Chromatogramm von (a) 2-Hydroxy-NT-Glucuronid und (b) 10,11-Dihydroxy-NT-Glucuronid nach der Auftrennung durch Fließmittel E

Tab.3: R_F-Werte bei der DC in Fließmittel F und Retentionszeiten (t_R) bei der HPLC der synthetisierten Glucuronide auf Nucleosil 10 µ C_{18}

Glucuronide	R_F	t_R (min)
2-OH-AT-Gluc	0,18	16,7
E-10-OH-AT-Gluc	0,28	26,5
Z-10-OH-AT-Gluc	0,31	42 - 59 *
2-OH-NT-Gluc	0,32	13,4
E-10-OH-NT-Gluc	0,35	22,1
Gluc des Enantiomeren	0,35	27,8
Z-10-OH-NT-Gluc	0,35	43,8
Gluc des Enantiomeren	0,35	54,5

* Eine Auftrennung war durch 4 flache Peaks angedeutet. Wahrscheinlich handelte es sich um die beiden diastereomeren Formen der O- und der N-Glucuronide.

Fließmittel F: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1)
HPLC-Eluens: Wasser/Methanol/0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 (160 : 90 : 40)

Tab.4: R_F-Werte bei der DC in Fließmittel F und Retentionszeiten der isolierten Konjugate bei der HPLC auf ODS-Hypersil 5 µ

Konjugate	O-Konjugate		N-Glucuronide	
	R_F	t_R(min)	R_F	t_R(min)
$OH\text{-}OCH_3$-AT-Gluc	0,14	16,6		
2-OH-AT-Gluc	0,18	16,6		
E-10-OH-AT-Gluc	0,28	31,9	0,38	23,0
Gluc des Enantiomeren	0,28	35,4	0,23	31,5
Z-10-OH-AT-Gluc	0,29	61,4	0,29	53,0
Gluc des Enantiomeren	0,29	69,5		
10,11-$(OH)_2$-AT-Gluc	0,20	12,0	0,29	23,5
Gluc des Diastereomeren	0,20	26,0	0,27	42,0
2-OH-NT-Gluc	0,28	14,4		
2-OH-NT-Sulfat	0,56	36,1		
E-10-OH-NT-Gluc	0,35	35,2		
Gluc des Enantiomeren	0,35	43,1		
Z-10-OH-NT-Gluc	0,35	72,0		
Gluc des Enantiomeren	0,35	89,1		
10,11-$(OH)_2$-NT-Gluc	0,28	14,9		
Gluc des Diastereomeren	0,28	28,2		
E-10-OH-DM_2-AT-Gluc	0,43	30,2		
Gluc des Enantiomeren	0,43	44,9		

3.3. Versuche zum Nachweis von Glutathion-Konjugaten

3.3.1. Vergleich der Aufarbeitungen ohne und mit enzymatischer Dekonjugation

Die Versuche mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase-Behandlung vor der Trennung der Metaboliten dienten dazu, Glucuronide und Sulfate möglichst weitgehend zu spalten, die Aglyka abzutrennen und in der verbleibenden Fraktion polarer Metaboliten gezielt nach Glutathion-Konjugaten zu suchen.

Ein Vergleich der enzymatisch dekonjugierten mit der nicht dekonjugierten Rattengalle ließ jedoch bei der HPLC ein gleiches Metabolitenspektrum erkennen, das sich vorwiegend nur in der Quantität unterschied. Ebenso verhielt es sich bei der inkubierten und der nicht inkubierten Fraktion des Harns der Versuchsperson. Deshalb war zu vermuten, daß es sich in allen Fällen um Glucuronide und Sulfate handelte, die in dem Falle der Behandlung der Probe mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase eben nicht vollständig gespalten wurden (s. unter 3.4.2.).

Der Nachweis der Glucuronsäure nach der sauren Hydrolyse der Metaboliten war auch bei den inkubierten Fraktionen positiv.
Das Aglykon ergab nach der enzymatischen Hydrolyse mit Phenothiazin-Reagenz typische Farbreaktionen, aber infolge der Verunreinigung durch andere Substanzen konnte der R_F-Wert nicht sicher ermittelt werden.

Diese Versuche erbrachten also keinen Hinweis auf das Vorliegen von Glutathion-Konjugaten.

3.3.2. Vergleich der Aufarbeitungen ohne und mit Diazomethan-Behandlung

Ein Vergleich der Chloroform- und der Essigesterextrakte bei erfolgter Diazomethan-Behandlung (s. 2.4.7.5.) mit den entsprechenden Extrakten einer unbehandelten Fraktion zeigte bei der methylierten Fraktion keine Erhöhung des extrahier-

baren Anteils nach der Methylierung, wodurch die Zweifel am Vorhandensein von Glutathion-Konjugaten vertieft wurden.

Den Chloroform- und Essigesterextrakten und den wäßrigen Phasen wurden Aliquots entnommen und die Radioaktivität gezählt (s. Tabelle 5).

Tab.5: Extraktionsausbeuten der mit Diazomethan behandelten und der nicht behandelten Fraktion

Diazomethan-Behandlung:	mit		ohne	
	dpm	%	dpm	%
Chloroform-Extrakt	$43 \cdot 10^3$	10	$46 \cdot 10^3$	10
Essigester-Extrakt	$7 \cdot 10^3$	2	$23 \cdot 10^3$	5
wäßrige Phase	$379 \cdot 10^3$	88	$390 \cdot 10^3$	85
Sa.(=100%)	$429 \cdot 10^3$		$459 \cdot 10^3$	

3.3.3. Ergebnisse der Analyse auf Aminosäuren

In den aus dekonjugierter Galle isolierten Metabolitenfraktionen ließ sich weder durch DC (s. 2.4.10.2.3.2.) noch durch HPLC (s. 2.4.10.2.3.3.) eine der Aminosäuren nachweisen. In Tabelle 6 sind die R_F-Werte bei der DC und die Retentionszeiten bei der HPLC der Dansylierungsprodukte aufgeführt. Abbildung 7 zeigt die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von dansyliertem Glutathion.

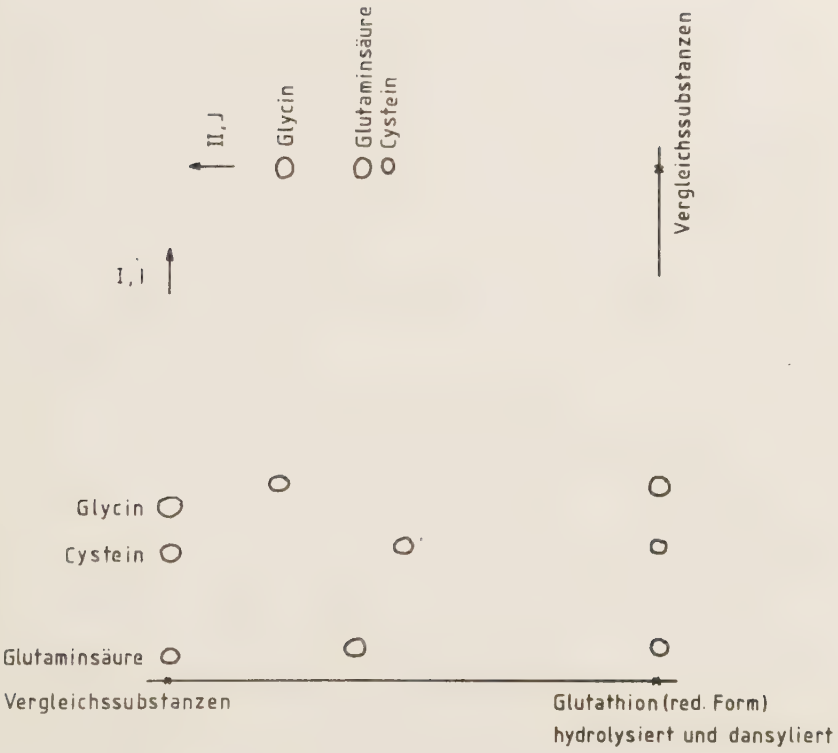


Abb.7: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von hydrolysiertem und dansyliertem Glutathion

1.Dimension: Fließmittel I
2.Dimension: Fließmittel J

Tab.6: R_F-Werte bei der DC und Retentionszeiten bei der HPLC der Dansylierungsprodukte

Dansylierungsprodukt	R_F-Wert in Fließmittel I	J	t_R (min)
Dansylamid			6,2
Cystein	0,25	0,53	6,1 *
Glutaminsäure	0,05	0,58	7,2
Glycin	0,34	0,73	8,6
Dansyläthylamid			21,1
Dansylpropylamid			39,2
Gemisch der 3 Aminosäuren:			
Cystein	0,27	0,5	
Glutaminsäure	0,07	0,6	
Glycin	0,45	0,75	
Glutathion (red. Form):			
Cystein	0,22	0,49	6,1 *
Glutaminsäure	0,07	0,68	6,9
Glycin	0,38	0,8	8,9

* Der Cystein-Peak wurde bei der HPLC des Dansylierungsgemisches vom Dansylamid-Peak überlagert. Die hier aufgeführte Retentionszeit ergab sich durch HPLC des nach der DC vom Chromatogramm ausgekratzten und eluierten Cystein-Flecks.

3.4. Identifizierung der Metaboliten

3.4.1. Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Aglyka

Die R_F-Werte der Aglyka in verschiedenen Fließmitteln sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Aglyka der hydrolysierten Glucuronide stimmten im R_F-Wert mit den Vergleichssubstanzen überein.

Die isolierten Metaboliten ergaben auf den DC-Folien mit Sprühreagenzien die gleichen Farben wie die Vergleichssubstanzen (s. Tabelle 7).

Die Glucuronsäure wurde nach der sauren Spaltung auf der DC-Folie mit Phloroglucin-Orthophosphorsäure-Lösung und anschließendem Erhitzen sichtbar gemacht. Sowohl die Glucuronsäure als Vergleichssubstanz als auch die isolierten Glucuronide zersetzten sich bei der Hydrolyse, wobei sich aber alle Zersetzungsprodukte rotviolett färbten.

Tab.7: R_F-Werte und Farbreaktionen der Aglyka der isolierten und hydrolysierten Glucuronide in den verwendeten Fließmitteln

Metaboliten	R_F-Werte C_2	D_1	D_2	Farbreaktionen Phenothiazin-Reagenz	Ninhydrin-Reagenz
OH-OCH_3-AT	0,51	0,51		gelb-braun	farblos
2-OH-AT	0,61	0,33	0,73	gelb	"
E-10-OH-AT	0,59	0,62	0,89	grau-grün	"
Z-10-OH-AT	0,51			grau-grün	"
10,11-$(OH)_2$-AT	0,45	0,3	0,64	rot-violett *	"
isomere Form	0,37			rot-violett *	"
2-OH-NT	0,27		0,6	gelb-braun	violett
E-10-OH-NT	0,21		0,71	grau-grün	"
Z-10-OH-NT	0,17		0,63	grau-grün	"
10,11-$(OH)_2$-NT	0,07		0,28	rot *	rosa-viol.
isomere Form	0,09		0,36	rot *	"
E-10-OH-DM_2-AT	0,3			grau-grün	rot-braun

* Beim Erkalten Übergang in Gelb

3.4.2. Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse

Die Frage der Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse wurde an Hand von HPLC-Fraktionen von nativem und enzymatisch dekonjugiertem Harn untersucht.

Hydrolysiert wurden ^{14}C-markiertes E-10-OH-AT- und E-10-OH-NT-Glucuronid aus nativem Harn und zwei Konjugate aus enzymatisch dekonjugiertem Harn (s. 2.4.10.1.1.).

Reine Glucuronide sind unter diesen Bedingungen normalerweise gut spaltbar. Polare Fraktionen aus dekonjugiertem Harn enthalten sehr schwer spaltbare Glucuronide und andere hochpolare Verbindungen, in denen sich keine Aminosäuren nachweisen ließen.

Nach der Extraktion der hydrolysierten Verbindungen mit Chloroform wurde durch Entnahme eines Aliquots die Radioaktivität der Chloroform- und der wäßrigen Phase gezählt (s. Tabelle 8).

Der Chloroform-Extrakt wurde auf DC-Folien aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme der Aglyka aus enzymatisch dekonjugiertem Harn wiesen starke Verunreinigungen auf.

Tab.8: Enzymatische Hydrolysierbarkeit von Metabolitenfraktionen aus nativem und enzymatisch dekonjugiertem Harn

	eingesetzte dpm	dpm in der $CHCl_3$-Phase	Hydrolysierbarkeit
aus nativem Harn:			
E-10-OH-AT-Gl	$6{,}7 \cdot 10^3$	$6{,}1 \cdot 10^3$	91 %
E-10-OH-NT-Gl	$8{,}0 \cdot 10^3$	$7{,}8 \cdot 10^3$	97 %
aus dekonj. Harn:			
Peak A	$11{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}9 \cdot 10^3$	17 %
Peak B	$24{,}1 \cdot 10^3$	$11{,}4 \cdot 10^3$	47 %

3.4.3. Acetylierung

Das N-Glucuronid von E-10-OH-NT sollte vom O-Glucuronid dadurch unterscheidbar sein, daß es unter milden Bedingungen nicht N-acetyliert werden kann. Nach enzymatischer Dekonjugation würden sich dann unterschiedliche Aglyka nachweisen lassen. Allerdings wurde ein N-Glucuronid von E-10-OH-NT weder beim Menschen noch bei der Ratte gefunden.

In analoger Weise wurde gezeigt, daß es sich bei den Glucuroniden von Z-10-OH-NT und von E-10-OH-DM_2-AT um O-Glucuronide handelte. Dehydro-NT wurde acetyliert, um festzustellen, ob das Molekül bei der Acetylierung dehydratisiert wird.

Die R_F-Werte der acetylierten und der nicht acetylierten Metaboliten von NT in den Fließmitteln G und H sind in Tabelle 9 aufgeführt. Nach Acetylierung und Hydrolyse (s. 2.4.10.1.1.) erhielt man acetylierte Derivate, die im R_F-Wert mit den Vergleichssubstanzen übereinstimmten. Abbildung 8 zeigt die entsprechende Dünnschichtchromatographie.

Tab.9: R_F-Werte der acetylierten und der nicht acetylierten Metaboliten von NT in den verwendeten Fließmitteln G und H

Substanzen	R_F in G	R_F in H
E-10-OH-NT	0,23	0,36
N-Acetyl-E-10-OH-NT	0,36	0,52
Z-10-OH-NT	0,21	
N-Acetyl-Z-10-OH-NT	0,38	
E-10-OH-DM_2-AT	0,19	0,22
N-Acetyl-E-10-OH-DM_2-AT	0,24	0,47
Dehydro-NT	0,56	0,43
N-Acetyl-dehydro-NT	0,71	0,63

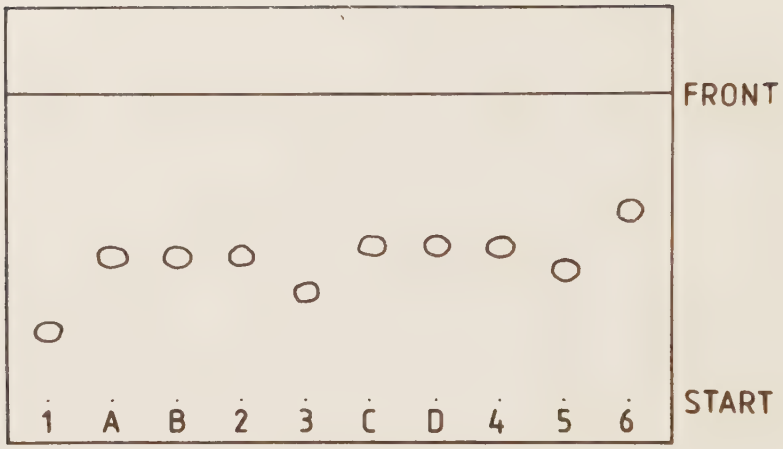


Abb.8: Dünnschichtchromatographie von acetylierten NT-Metaboliten in Fließmittel H

1: E-10-OH-DM_2-AT
2: N-Acetyl-E-10-OH-DM_2-AT
3: E-10-OH-NT
4: N-Acetyl-E-10-OH-NT
5: Dehydro-NT
6: N-Acetyl-Dehydro-NT

A: Acetyliertes und hydrolysiertes O-Glucuronid von E-10-OH-DM_2-AT aus der Galle einer NT-behandelten Ratte
B: Enantiomer zu A, gewonnen aus dem diastereomeren O-Glucuronid
C: Acetyliertes und hydrolysiertes O-Glucuronid von E-10-OH-NT aus der Galle einer NT-behandelten Ratte
D: Enantiomer zu C, gewonnen aus dem diastereomeren O-Glucuronid

3.4.4. Biosynthese der Glucuronide

Die ersten Syntheseversuche wurden mit ^{14}C-markierten Metaboliten unternommen, zunächst um die notwendige Inkubationsdauer zu bestimmen, aber auch um Aussagen über die Ausbeute machen zu können.

3.4.4.1. Inkubation mit Lebermikrosomen

3.4.4.1.1. Versuche zur Bestimmung der notwendigen Inkubationsdauer

In Vorversuchen mit ^{14}C-markiertem E-10-OH-AT wurde die Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen und die Radioaktivität der wäßrigen Phase gezählt, nachdem der nicht umgesetzte Anteil des Aglykon durch Extraktion mit Chloroform entfernt worden war.

Eine 0,45 mM ^{14}C-E-10-OH-AT-Lösung wurde mit Lebermikrosomen inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 30, 60, 90 und 120 min (s. Tabelle 10).

Tab.10: Inkubation von ^{14}C-E-10-OH-AT mit Lebermikrosomen

Zeit (min)	aufgearbeitetes Aliquot (µl)	dpm im Ansatz	dpm in der H_2O-Phase	errechneter Umsatz (%)
0	50/6 000	$1{,}69 \cdot 10^6$	$10 \cdot 10^3$	0,6
30	50/5 950	$1{,}68 \cdot 10^6$	$83 \cdot 10^3$	5
60	50/5 900	$1{,}66 \cdot 10^6$	$118 \cdot 10^3$	7
90	50/5 850	$1{,}65 \cdot 10^6$	$175 \cdot 10^3$	11
120	50/5 800	$1{,}63 \cdot 10^6$	$208 \cdot 10^3$	13

Ein Leerwert, der einen gewissen Umsatz zum Zeitpunkt 0 vortäuscht, entsteht durch unvollständige Extraktion des Substrats.

Bei einem weiteren Vorversuch mit einer Inkubationsdauer bis zu 60 min betrug die Ausbeute 9 % . Für die folgenden Biosynthesen der Glucuronide wurde eine Inkubationszeit von 60 min gewählt.

3.4.4.1.2. Ausbeute der Glucuronidsynthese

^{14}C-markierte Aglyka (2-OH-AT und -NT, E-10-OH-AT und -NT) wurden 60 min mit Lebermikrosomen inkubiert. Nach der Extraktion mit Chloroform wurde die Radioaktivität der wäßrigen Phase gezählt und daraus die Ausbeute errechnet (s. Tabelle 11).

Tab.11: Ausbeute bei der Biosynthese von Glucuroniden während 60-minütiger Inkubation

Aglykon	dpm im Ansatz	dpm in der H_2O-Phase	Ausbeute (%)
2-OH-AT	$1,52 \cdot 10^6$	$1,14 \cdot 10^6$	75
2-OH-NT	$0,31 \cdot 10^6$	$0,15 \cdot 10^6$	48
E-10-OH-AT	$1,95 \cdot 10^6$	$0,20 \cdot 10^6$	10
E-10-OH-NT	$1,07 \cdot 10^6$	$0,09 \cdot 10^6$	8

3.4.4.2. Glucuronidsynthese in vivo

Nach Legen der Gallenfisteln wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Pharmaka in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht im Bauchraum der Ratten verteilt. Die Galle wurde jeweils 8 Stunden lang gesammelt und dann (wie unter 2.4.8. beschrieben) aufgearbeitet.

Bei den Angaben über die gewonnene Menge handelt es sich um ungefähre quantitative Daten, die ermittelt wurden durch Vergleich der Peakfläche von unmarkierten Glucuroniden mit der Peakfläche von radioaktiven AT-Metaboliten, aus deren dpm-Zahlen die Substanzmenge bestimmt worden war.

Für Urinaufarbeitungen wurde errechnet, daß 1 cm^2 Peakfläche einer Glucuronid-Menge von ca. 1,05 µg bzw. 2,3 nmol entspricht unter folgenden Registrierbedingungen: Vollausschlag (25 cm) bei einer Absorption von 0,32 ; Papiervorschubgeschwindigkeit von 1 cm/min , Nucleosil C_{18}. Für Aufarbeitungen von Rattengalle entspricht 1 cm^2 Peakfläche einer Glucuronid-Menge von ca. 0,80 µg bzw. 1,75 nmol bei gleicher Empfindlichkeit, aber ODS-Hypersil als Adsorbens.

Tab.12: Biosynthese von Glucuroniden von AT und seinen Metaboliten

Pharmakon	Dosis (mg)	isolierte Konjugate	gewonnene Menge (µg)	% der Dosis
AT	38,8 (6 Ratten)	E-10-OH-AT-O-Gluc (Diastereomerengem.)	2 270	3,5
		E-10-OH-AT-N-Gluc und Gluc des Enantiomeren	Spuren "	
		Z-10-OH-AT-O-Gluc	50	0,07
		und Gluc des Enantiomeren	20	0,03
		Z-10-OH-AT-N-Gluc	220	0,4
		2-OH-AT-O-Gluc	1 250	2,0
		$OH\text{-}OCH_3$-AT-O-Gluc	170	0,3
		10,11-$(OH)_2$-AT-O-Gluc	980	1,6
		und Gluc des Diastereomeren	110	0,1

Tab.12 (Fortsetzung):

Pharmakon	Dosis (mg)	isolierte Konjugate	gewonnene Menge (µg)	% der Dosis
		E-10-OH-NT-O-Gluc	500	0,8
		und Gluc des Enantiomeren	70	0,1
		Z-10-OH-NT-O-Gluc	Spuren	
		10,11-$(OH)_2$-NT-O-Gluc *	110	0,1
		und Gluc des Diastereomeren	70	0,1
		E-10-OH-DM_2-AT-O-Gluc	Spuren	
		und Gluc des Enantiomeren	"	
			Sa.	9,1
NT	12,4 (2 Ratten)	E-10-OH-NT-O-Gluc	1 020	4,7
		und Gluc des Enantiomeren	190	0,9
		Z-10-OH-NT-O-Gluc	10	0,06
		2-OH-NT-O-Gluc + 10,11-$(OH)_2$-NT-O-Gluc	340	1,5
		und Gluc des Diastereomeren	90	0,4
		E-10-OH-DM_2-AT-O-Gluc	260	1,2
		und Gluc des Enantiomeren	60	0,3
			Sa.	9,1

* mit Spuren von 2-OH-NT-O-Gluc verunreinigt

Tab.12 (Fortsetzung):

Pharmakon	Dosis (mg)	isolierte Konjugate	gewonnene Menge (µg)	% der Dosis
E-10-OH-AT	7,1	E-10-OH-AT-O-Gluc	620	5,6
		und Gluc des Enantiomeren	110	1,0
		10,11-$(OH)_2$-AT-O-Gluc	120	1,1
		und Gluc des Diastereomeren	10	0,09
		E-10-OH-NT-O-Gluc	280	2,5
		und Gluc des Enantiomeren	40	0,4
		10,11-$(OH)_2$-NT-O-Gluc	25	0,2
		und Gluc des Diastereomeren	Spuren	
		E-10-OH-DM_2-AT-O-Gluc	40	0,4
		und Gluc des Enantiomeren	10	0,09
				Sa. 11,4
Z-10-OH-AT	7,1	Z-10-OH-AT-O-Gluc	250	2,2
		und Gluc des Enantiomeren	220	2,2
		10,11-$(OH)_2$-AT-O-Gluc	130	1,2
		und Gluc des Diastereomeren	40	0,4
		10,11-$(OH)_2$-AT-N-Gluc	60	0,5
		Z-10-OH-NT-O-Gluc	60	0,5
		und Gluc des Enantiomeren	25	0,2
		10,11-$(OH)_2$-NT-O-Gluc	50	0,5
		und Gluc des Diastereomeren	10	0,09
				Sa. 7,6

Tab.12 (Fortsetzung):

Pharmakon	Dosis (mg)	isolierte Konjugate	gewonnene Menge (µg)	% der Dosis
E-10-OH-NT aus Patienten-harn gewonnen:	6,0	E-10-OH-NT-O-Gluc	540	5,5
		und Gluc des Enantiomeren	40	0,4
			Sa.	5,9
E-10-OH-NT synthetisch:	13,8 (2 Ratten)	E-10-OH-NT-O-Gluc	1 330	5,8
		und Gluc des Enantiomeren	600	2,6
		$10,11\text{-}(OH)_2$-NT-O-Gluc	85	0,4
		und Gluc des Diastereomeren	40	0,2
		$E\text{-}10\text{-}OH\text{-}DM_2$-AT-O-Gluc	80	0,4
		und Gluc des Enantiomeren	40	0,2
			Sa.	9,6
Z-10-OH-NT	5,3	Z-10-OH-NT-O-Gluc	180	2,1
		und Gluc des Enantiomeren	60	0,7
		$10,11\text{-}(OH)_2$-NT-O-Gluc	120	1,4
		und Gluc des Diastereomeren	25	0,3
			Sa.	4,5

In den Abbildungen 9 und 10 sind HPLC-Trennungen der optischen Isomeren von E-10-OH-NT- und E-10-OH-AT-O-Glucuronid zu sehen.

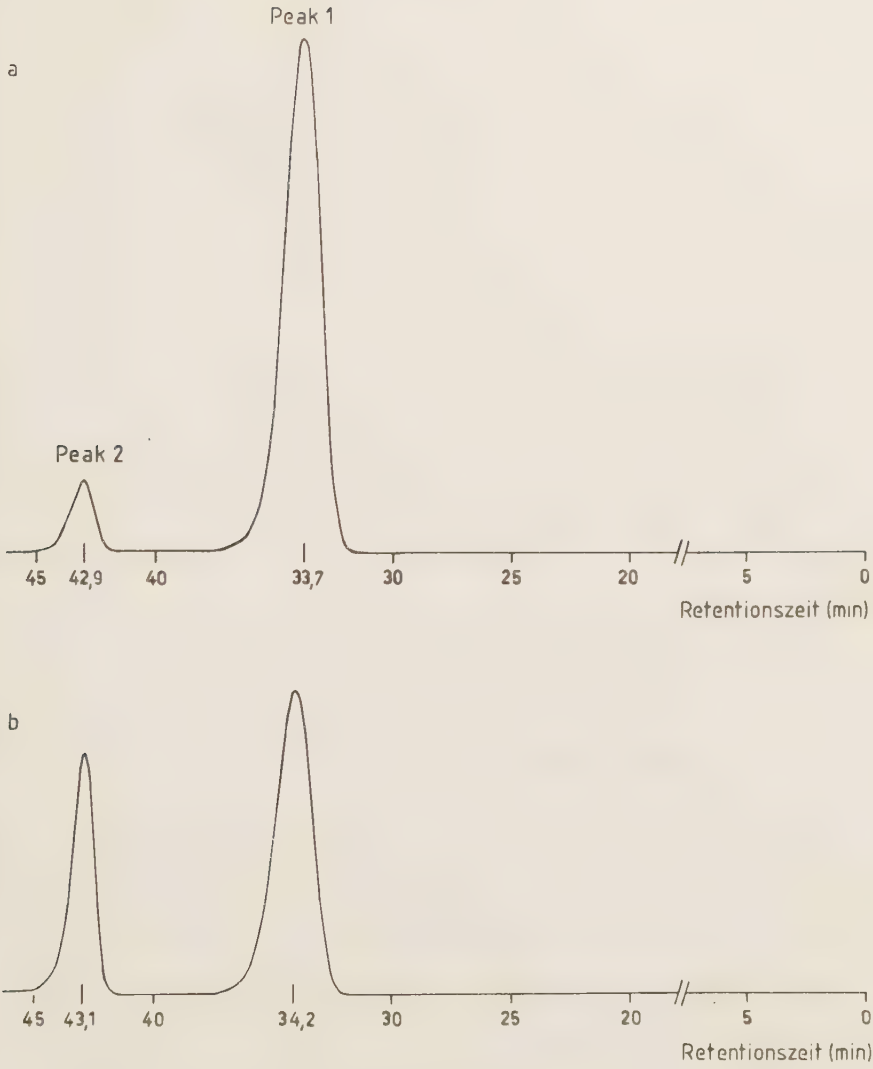


Abb.9: HPLC-Trennung der optischen Isomeren von E-10-OH-NT-O-Glucuronid

a) nach Behandlung einer Ratte mit E-10-OH-NT, das als AT-Metabolit aus Patientenharn gewonnen worden war

b) nach Behandlung einer Ratte mit synthetischem E-10-OH-NT

Bei Behandlung einer Ratte mit AT oder NT entstehen Peak 1 und 2 in einem ähnlichen Verhältnis wie bei (a).

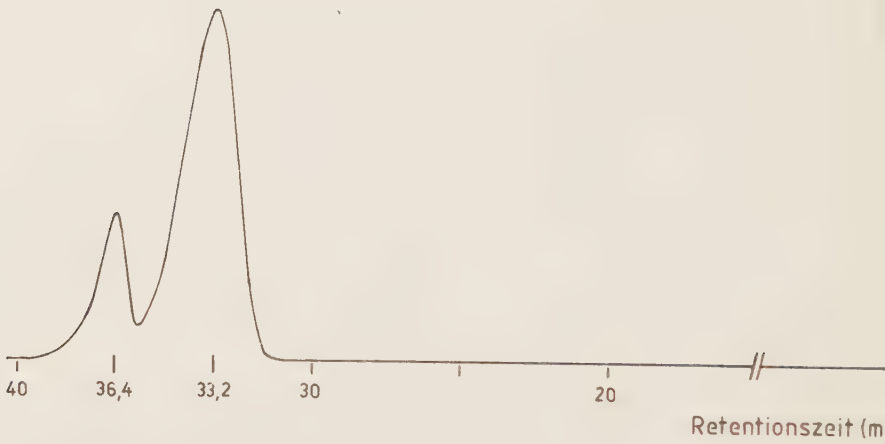


Abb.10: HPLC-Trennung der optischen Isomeren von E-10-OH-AT-O-Glucuronid

3.4.5. UV-Spektrophotometrie

Phenole weisen im UV-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 250 nm auf. Dieses Maximum kann durch Alkalisierung der Meßlösung mit Natriumhydroxyd-Lösung verschoben werden, wobei sich das entsprechende Phenolat bildet (s. Abb. 11a).

Da bei einem phenolischen Glucuronid (2-OH-AT-Glucuronid, 2-OH-NT-Glucuronid und OH-OCH_3-AT-Glucuronid) die Glucuronsäure an der phenolischen Hydroxylgruppe gebunden ist, kann bei der Alkalisierung nicht das Phenolat gebildet werden, so daß keine Verschiebung des Absorptionsmaximums auftritt (s. Abbildung 11b).

Nicht-phenolische Konjugate lassen sich an einer Schulter um 235 nm erkennen (s. Abbildung 12).

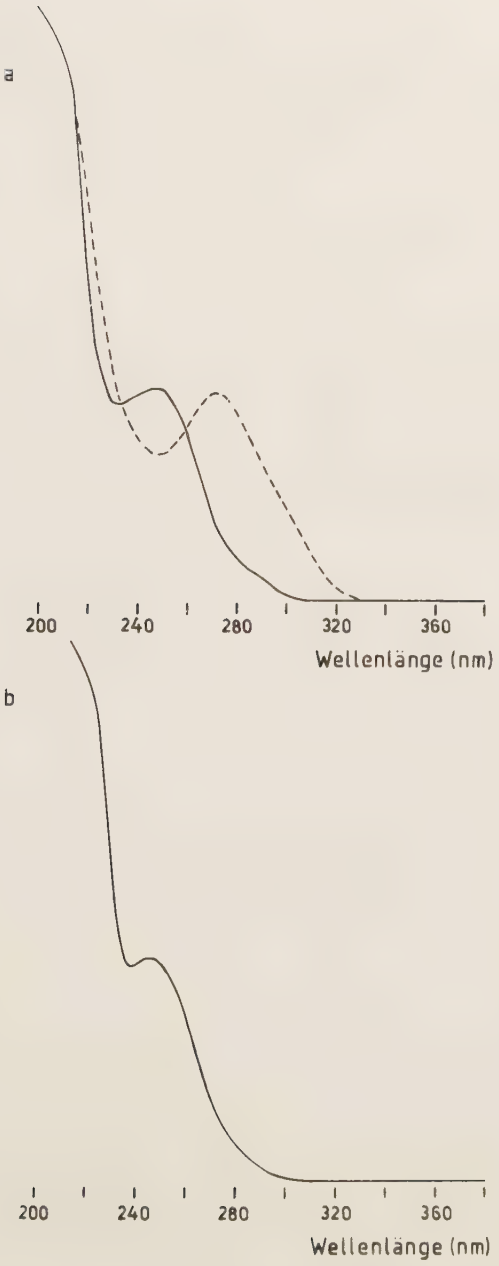


Abb.11: UV-Spektrum von (a) 2-OH-AT in saurer (——) und in alkalischer Lösung (---) und von (b) 2-OH-AT-Gluc

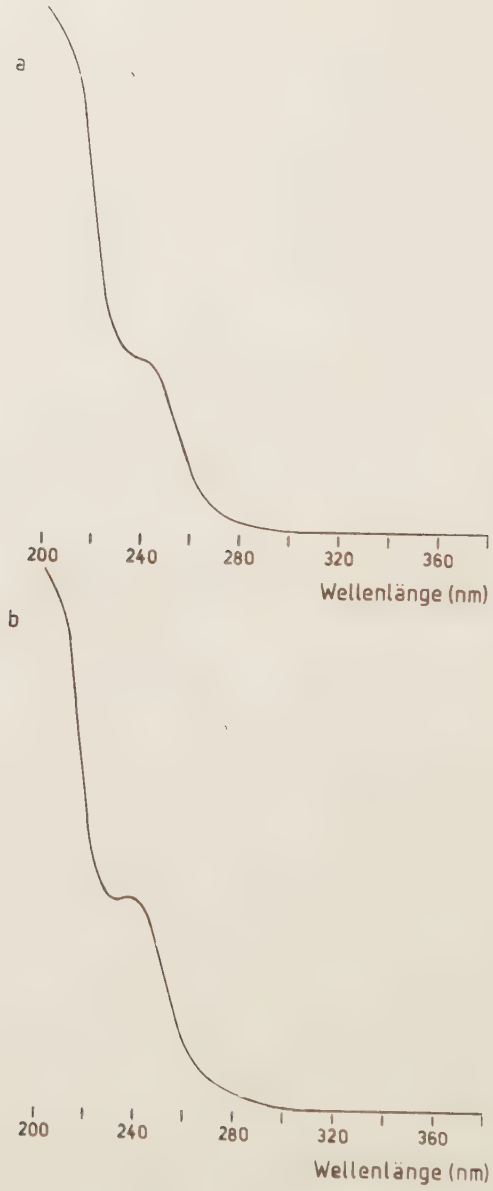


Abb.12: UV-Spektrum von (a) E-10-OH-NT-O-Glucuronid und von (b) 10,11-$(OH)_2$-AT-O-Glucuronid

3.4.6. Strukturaufklärung durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie

Die Spektren wurden von Prof. Dr. A. Prox, Abt. Chemische Forschung der Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, interpretiert.

2-OH-AT-O-Glucuronid:

Im FAB-Spektrum erscheint das (M+H)-Ion wie für ein monohydroxyliertes AT-Glucuronid bei m/z 470. Basispeak ist m/z 58, d.h. es liegt ein O-Glucuronid vor.

Diese Befunde werden durch das ^{1}H-NMR bestätigt. Im ^{1}H-NMR sind aromatische Protonen unter 7 ppm nachweisbar (s. Abbildung 13).

E- bzw. Z-10-OH-AT-O-Glucuronid:

Das FAB-Spektrum ergibt ein (M+H)-Ion bei m/z 470. Stärkstes Ion im Spektrum ist m/z 58. Diese Daten sprechen für ein O-Glucuronid des monohydroxylierten AT (s. Abb. 15).

Das ^{1}H-NMR bestätigt diese Befunde (s. Abbildung 14).

Die Unterscheidung der E-/Z-Isomerie erfolgte durch DC nach enzymatischer Spaltung, die Unterscheidung der optischen Isomeren an Hand der Retentionszeiten bei der HPLC.

E- bzw. Z-10-OH-AT-N-Glucuronid:

Das (M+H)-Ion erscheint bei m/z 470 und verliert lediglich 176 ME unter Bildung von m/z 294. Da ein charakteristisches Signal bei m/z 58 fehlt, sollte es sich um ein quartäres N-Glucuronid des monohydroxylierten AT handeln (s. Abb. 16).

Bei allen Konjugaten mit freier, intakter Dimethylamino-Seitenkette erscheint im FAB-Spektrum als größtes Substanz-Ion m/z 58 ($H_2C{=}N^{\oplus}(CH_3)_2$). Dieses Ion fehlt oder tritt nur mit geringer Intensität - evtl. als Folge einer einsetzenden Solvolyse in der Glyzerin-Methanol-Matrix - auf, wenn es sich laut ^{1}H-NMR um ein quartäres N-Glucuronid handeln soll (s. Abbildung 17).

Das ^{1}H-NMR zeigt im Fehlen aromatischer Protonen unter 7 ppm, daß es sich um ein 10-Hydroxy-AT handelt. Die Signale für die basische Dimethylamino-Gruppe fehlen.

$OH\text{-}OCH_3$-AT-O-Glucuronid:

Das (M+H)-Ion erscheint bei m/z 500. 176 ME werden unter Bildung von m/z 324 abgespalten.

$10,11\text{-}(OH)_2$-AT-O-Glucuronid:

Mit (M+H) bei m/z 486 handelt es sich um ein Dihydroxy-AT-Glucuronid. Es werden sowohl Abspaltungen von 176 ME zu m/z 310 als auch von 194 ME zu m/z 292 beobachtet.

Das ^{1}H-NMR spricht für ein 10-O-Glucuronid des 10,11-Dihydroxy-AT, da die aromatischen Protonen unter 7 ppm fehlen.

$10,11\text{-}(OH)_2$-AT-N-Glucuronid:

Das (M+H)-Ion bei m/z 486 deutet auf ein Dihydroxy-AT. Ein Ion bei m/z 58 fehlt, so daß es sich um ein quartäres N-Glucuronid handelt.

2-OH-NT-O-Glucuronid:

Im FAB-Massenspektrum sind das (M+H)-Ion m/z 456 und das Ion m/z 44 nachweisbar. Beide sprechen für ein O-Glucuronid von 2-OH-NT.

Das ^{1}H-NMR läßt eine Kernhydroxylierung an verbreiterten Signalen unter 7 ppm erkennen.

2-OH-NT-O-Sulfat:

Im FAB-Massenspektrum ist das (M+H)-Ion m/z 360, das für ein Monohydroxy-NT-Sulfat spricht, nachweisbar.

Im ^{1}H-NMR sind aromatische Protonen unter 7 ppm nachweisbar.

E- bzw. Z-10-OH-NT-O-Glucuronid:

Das (M+H)-Ion im FAB-Spektrum ist bei m/z 456. Die Abspaltung von 176 ME zum Ion m/z 280 und von 194 ME zum Ion m/z 262 sprechen für ein O-Glucuronid des 10-OH-NT. Basispeak ist das Ion m/z 44, was ebenfalls für ein O-Glucuronid spricht.

Das ^{1}H-NMR bestätigt diese Befunde.

Bei Abbildung 18 handelt es sich um das Isomere, das bei der HPLC schneller eluiert wird und in überwiegender Menge aus dem als Metabolit gebildeten E-10-OH-NT entsteht. Abbildung 19 zeigt die enantiomere Form zu Abbildung 18. Sie wird bei der HPLC langsamer eluiert und in geringerer Menge aus E-10-OH-NT gebildet.

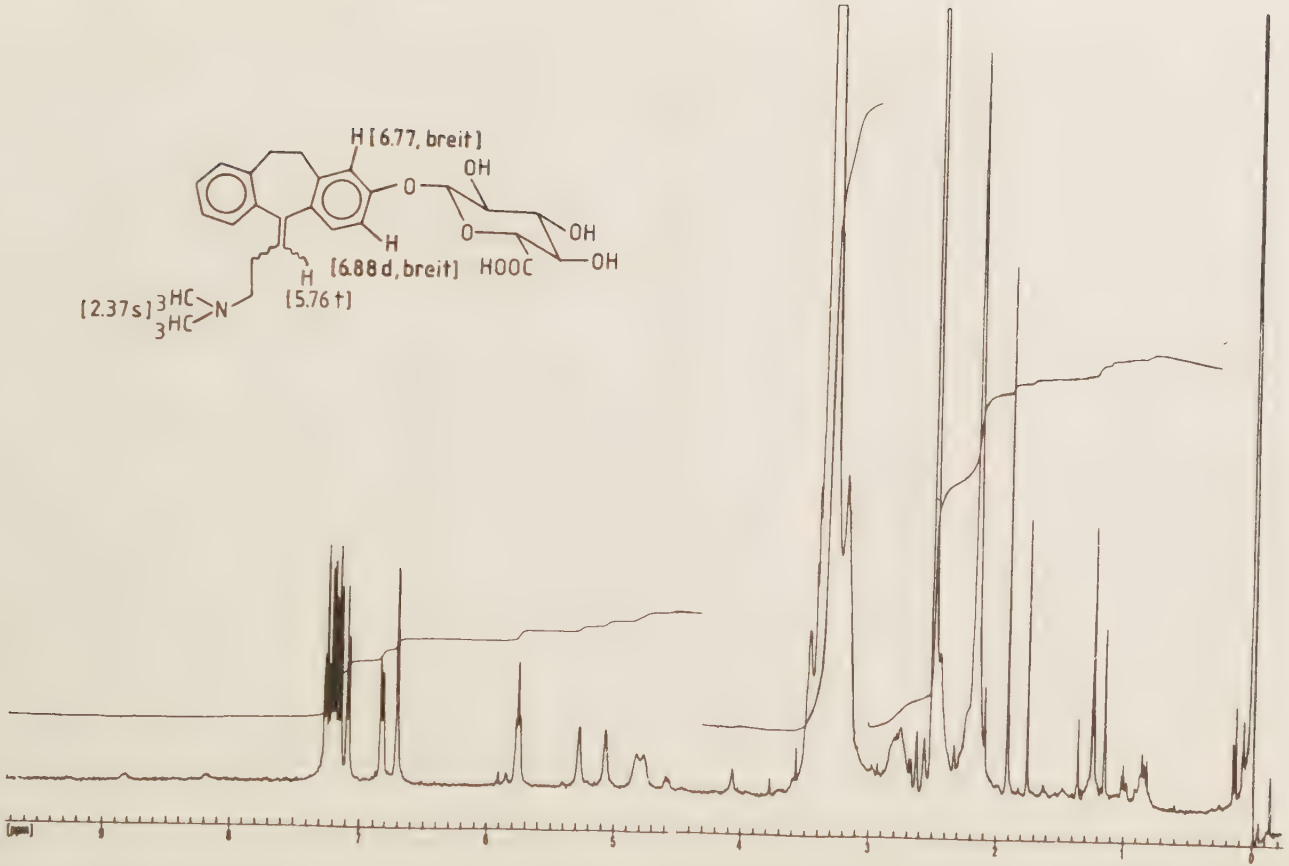
10,11-$(OH)_2$-NT-O-Glucuronid:

Das FAB-Spektrum ergibt ein (M+H)-Ion bei m/z 472. Basispeak ist das Ion m/z 44, was für ein O-Glucuronid spricht.

E-10-OH-DM_2-AT-O-Glucuronid:

Das FAB-Massenspektrum zeigt ein (M+H)-Ion bei m/z 442 und verliert 194 ME unter Bildung von m/z 248, was für ein O-Glucuronid des Monohydroxy-didesmethyl-amitriptylin spricht.

Das ^{1}H-NMR zeigt kein N-Methylsignal im Bereich um 2,4 ppm.


H [6.77, breit]
OH
O
O
OH
OH
H
[6.88 d, breit]
HOOC
H
[5.76 t]
[2.37 s] 3HC
3HC
N

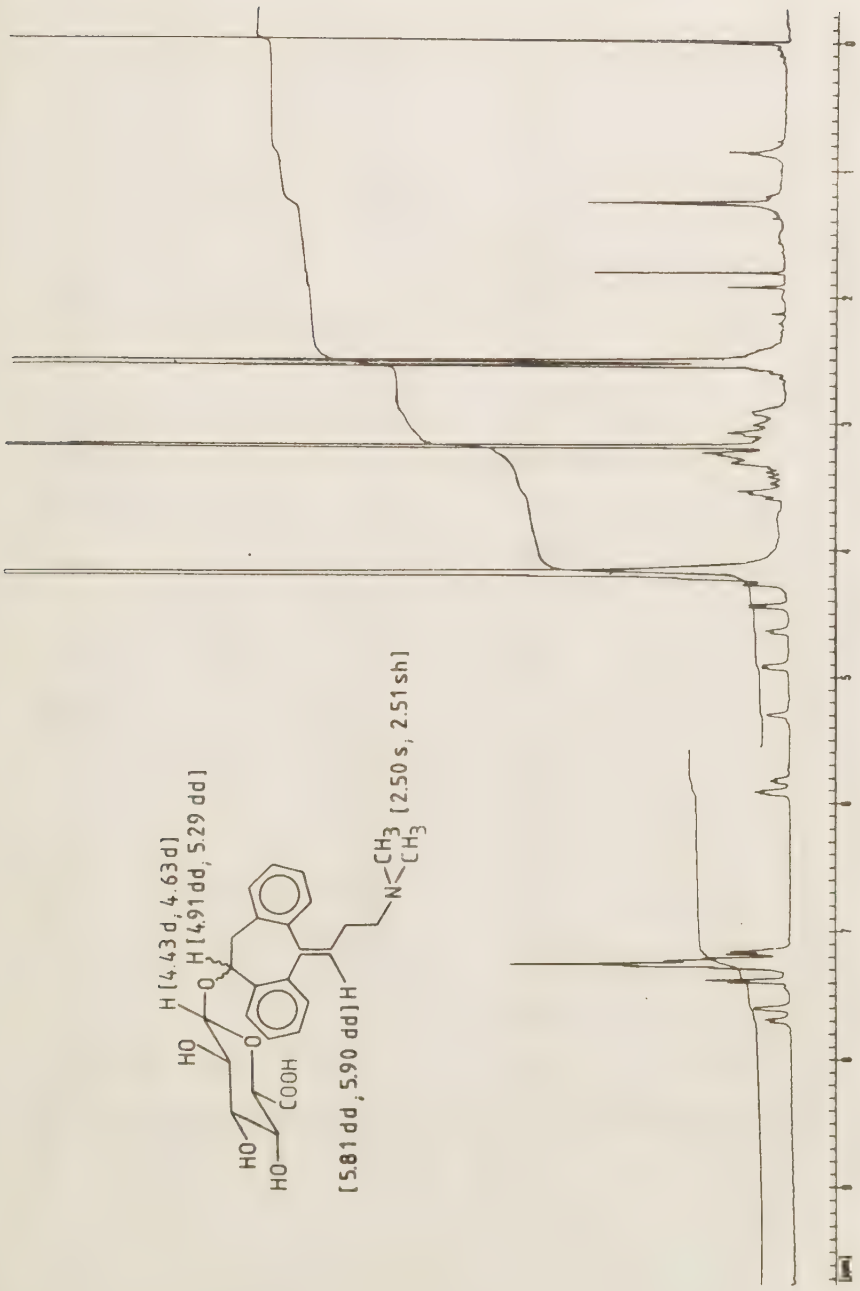


Abb.14: ^{1}H-NMR-Spektrum von E-10-OH-AT-O-Glucuronid

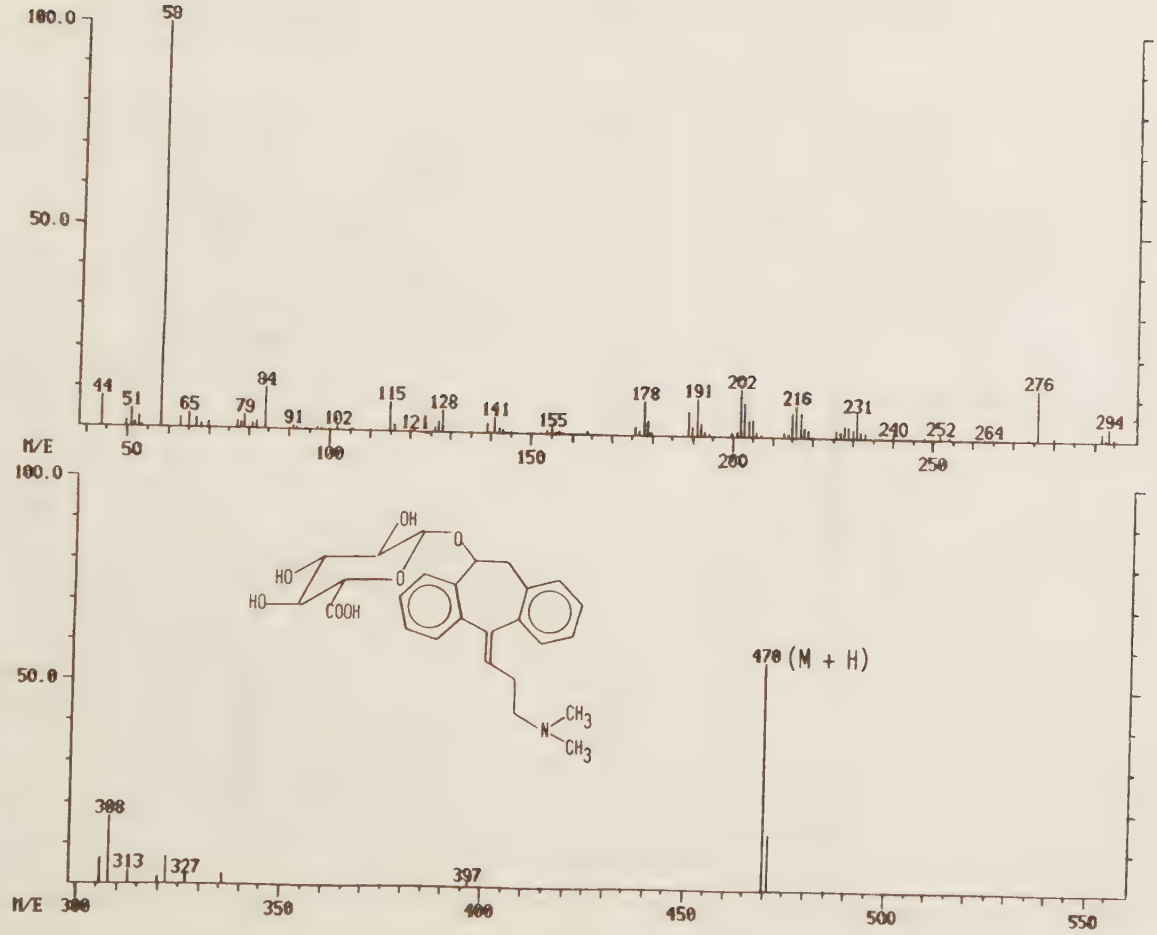


Abb.15: FAB-Massenspektrum von E-10-OH-AT-O-Glucuronid

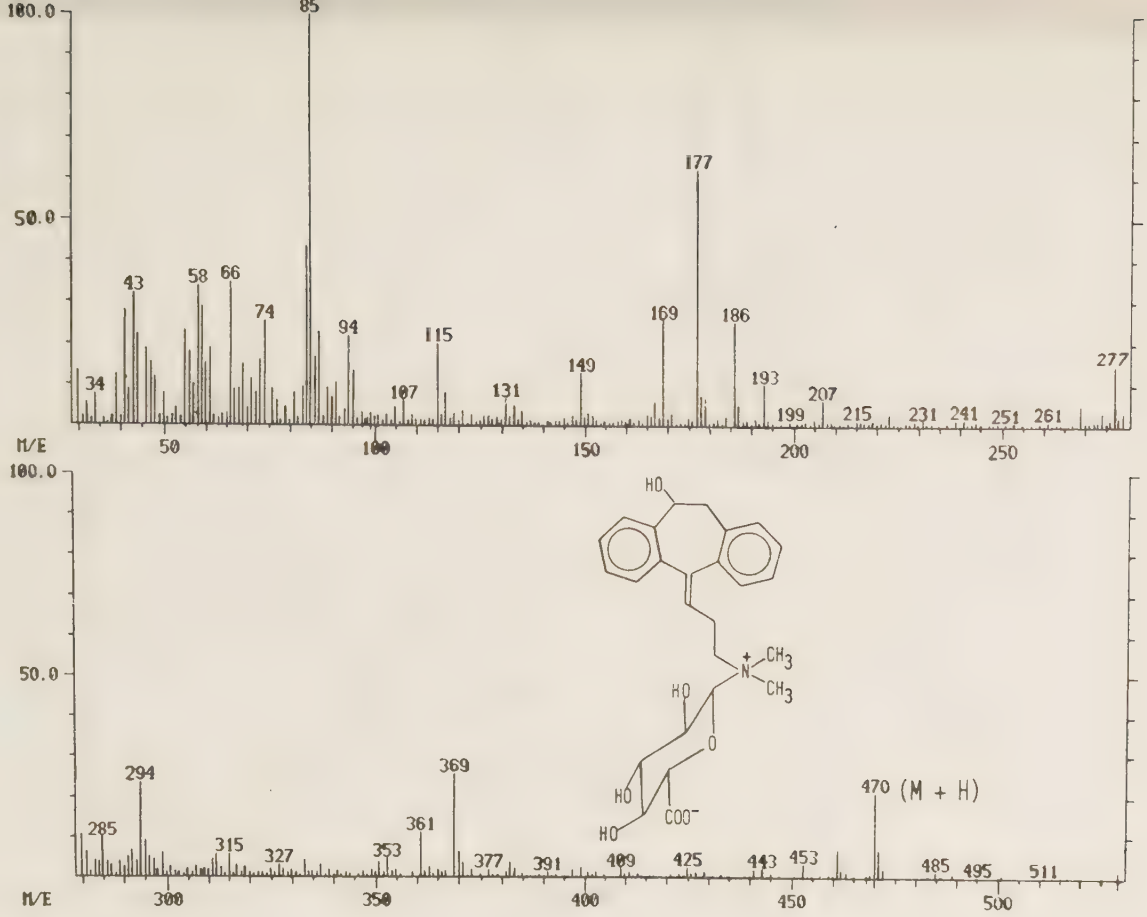
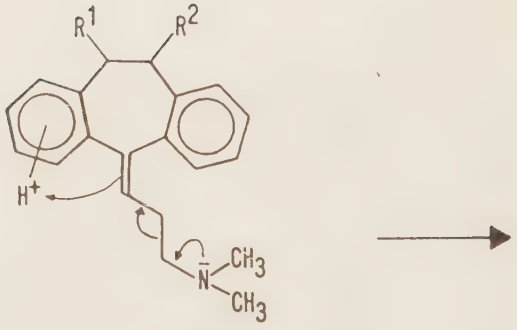
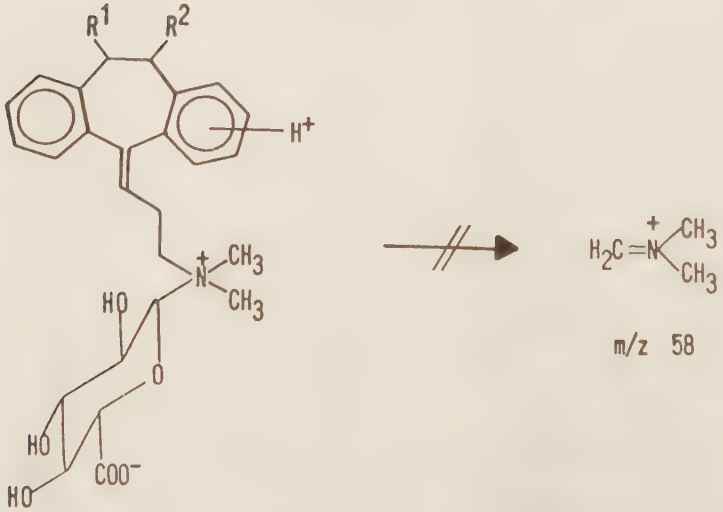


Abb.16: FAB-Massenspektrum von E-10-OH-AT-N-Glucuronid



m/z 58

R^1	R^2	$(M + H)^+$	
H	H	278	Amitriptylin
H	O-Glucuronid	470	Z-10-OH-AT-O-Glucuronid
O-Glucuronid	H	470	E-10-OH-AT-O-Glucuronid



m/z 58

R^1	R^2	$(M + H)^+$	
H	OH	470	Z-10-OH-AT-N-Glucuronid
OH	H	470	E-10-OH-AT-N-Glucuronid

Abb.17: Bildung des Basis-Ions m/z 58 bei der FAB-Massenspektrometrie von E- bzw. Z-10-OH-AT-Glucuronid

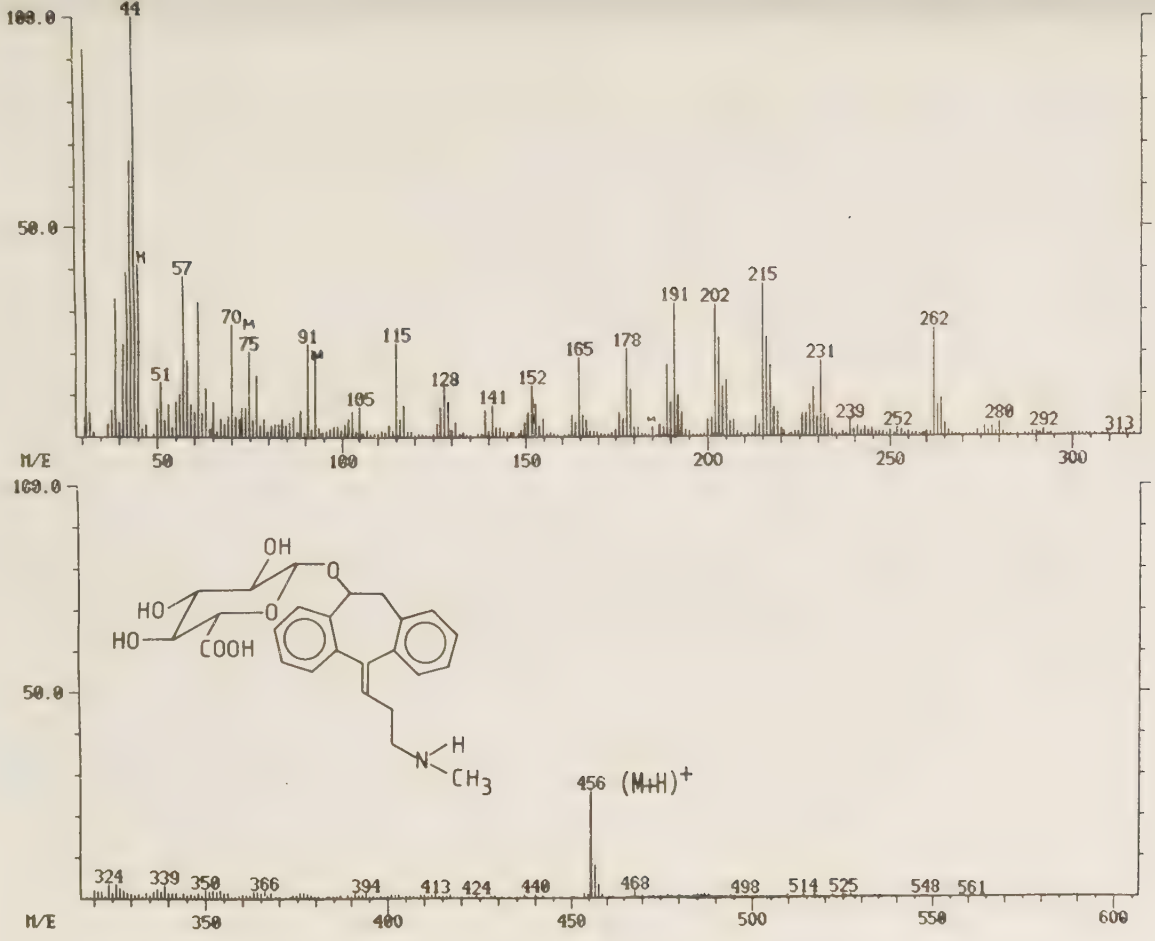


Abb.18: FAB-Massenspektrum von E-10-OH-NT-O-Glucuronid

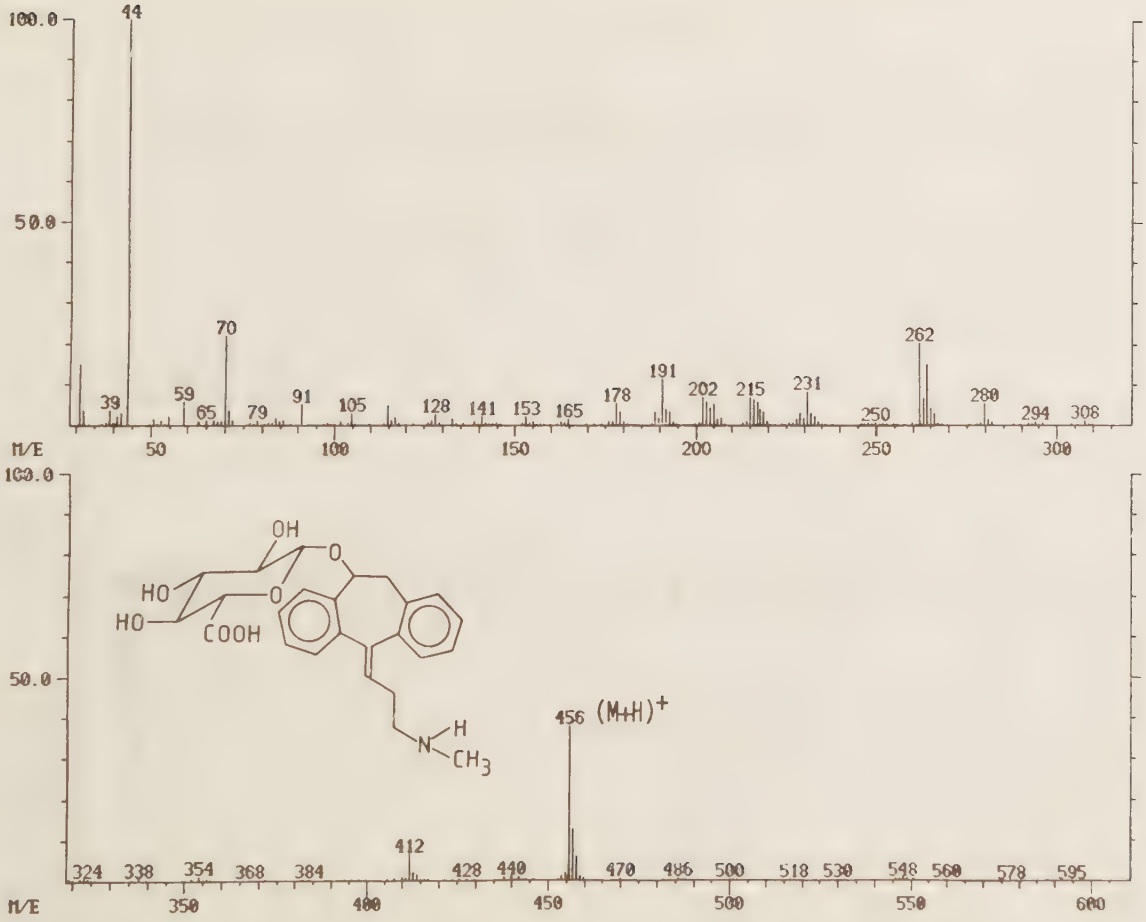


Abb.19: FAB-Massenspektrum von E-10-OH-NT-O-Glucuronid, enantiomere Form zu Abb.18

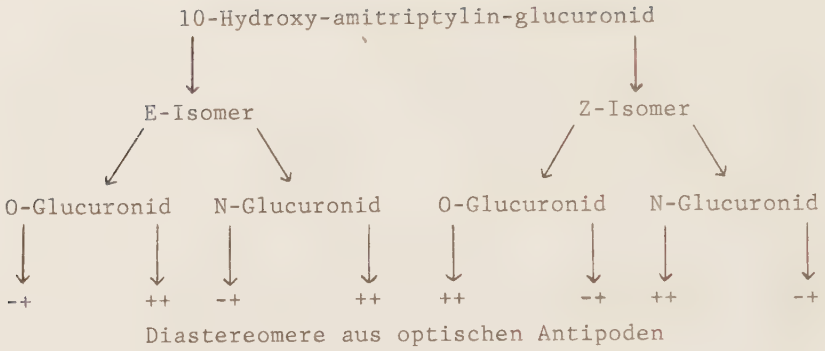
3.4.7. Zusammenfassung der identifizierten Konjugate

In der folgenden Tabelle sind alle Konjugate von Amitriptylin-Metaboliten aufgeführt, die aus Rattengalle und menschlichem Harn isoliert wurden und identifiziert werden konnten.

Tab.13: Isolierte und identifizierte Konjugate von Amitriptylin-Metaboliten bei Ratte und Mensch

Konjugat	gefunden bei Ratte	Mensch
2-OH-AT-Gluc	+	-
E-10-OH-AT-Gluc	+	+
Z-10-OH-AT-Gluc	+	+
OH-OCH_3-AT-Gluc	+	-
10,11-$(OH)_2$-AT-Gluc	+	+
2-OH-NT-Gluc	+	-
2-OH-NT-Sulfat	-	+
E-10-OH-NT-Gluc	+	+
Z-10-OH-NT-Gluc	+	+
10,11-$(OH)_2$-NT-Gluc	+	+
E-10-OH-DM_2-AT-Gluc	+	+

Von 10-Hydroxy-AT, -NT bzw. -didesmethyl-AT und ihren 10,11-Dihydroxy-Verbindungen ist die Bildung von 8 verschiedenen Glucuroniden möglich. Einige dieser möglichen Formen konnten durch HPLC getrennt und durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie, ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie oder durch Dünnschichtchromatographie aufgeklärt werden. Als Beispiel sind die Isomeren von 10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid aufgeführt (Schema 5).



Schema 5: Isomere von 10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid

Bis auf eine diastereomere Form des N-Glucuronids von Z-10-Hydroxy-AT konnten alle Formen isoliert und identifiziert werden. Die Zuordnung zu + bzw. - erfolgte in Analogie zu den gemessenen Drehungen (Bertilsson und Alexanderson, 1972) von aus menschlichem Harn isolierten E-10-OH-NT (Drehsinn: negativ) und Z-10-OH-NT (Drehsinn: positiv).

3.5. Pharmakologische Testung

Abbildung 20 zeigt die Hemmwirkung von AT, E-10-Hydroxy-AT, E-10-Hydroxy-NT und E-10-Hydroxy-AT-Glucuronid auf die Aufnahme von ^{14}C-Serotonin in menschliche Thrombozyten (s. 2.6.).

Während AT schon ab einer Konzentration von 0,05 µM die Serotonin-Aufnahme in Thrombozyten hemmt, ist bei seinem Metaboliten E-10-Hydroxy-AT erst ab 500 µM eine leichte Hemmwirkung zu erkennen. Das ist jedoch eine Konzentration, die bei der Metabolisierung von AT im menschlichen Körper nicht erreicht wird. E-10-Hydroxy-NT und E-10-Hydroxy-AT-Glucuronid zeigten bei den eingesetzten Konzentrationen keine Hemmwirkung.

In Bezug auf die getestete biochemische Wirkung führte die 10-Hydroxylierung von Amitriptylin zum Verlust der Wirksamkeit. Auch die pharmakologische Testung von E-10-Hydroxy-nortriptylin und E-10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid ließ keine biologische Aktivität erkennen.

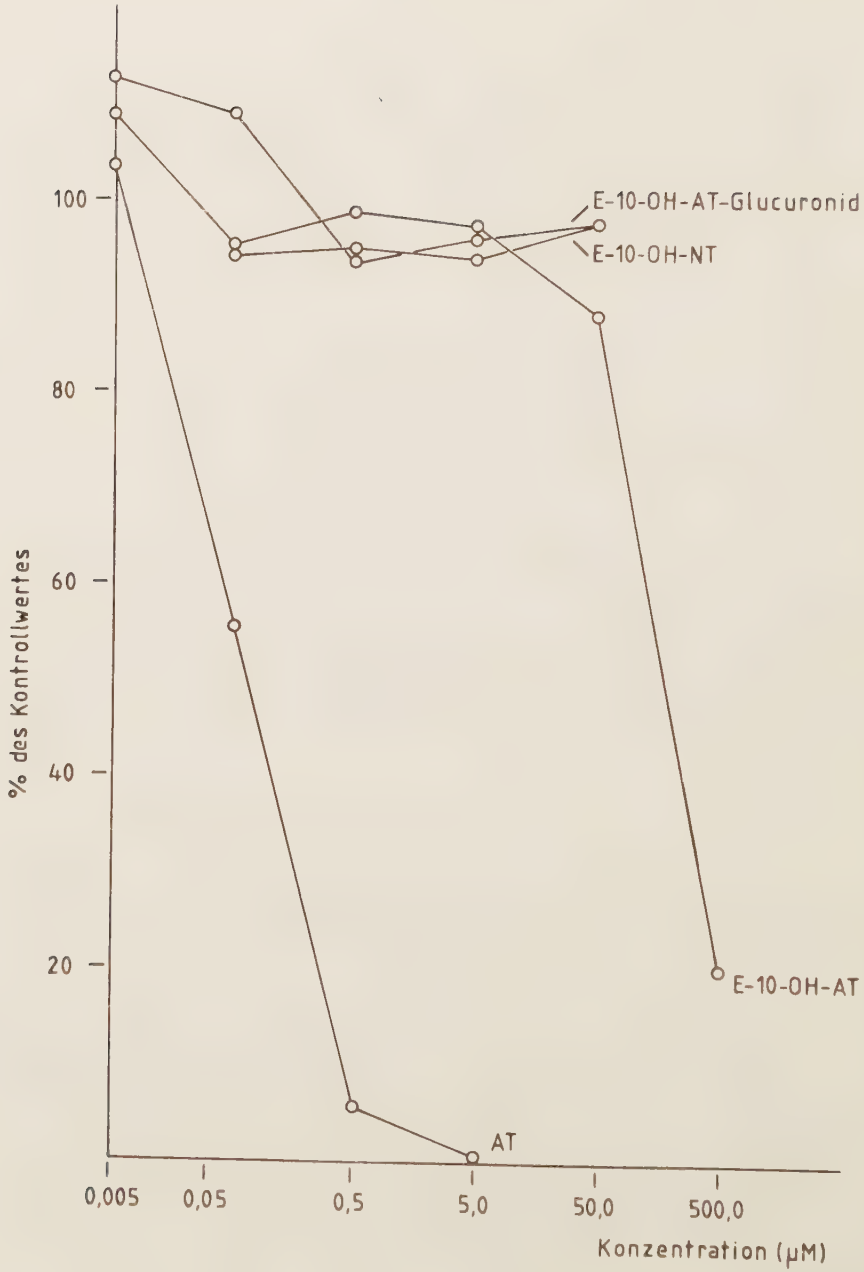


Abb.20: Hemmwirkung von AT, E-10-OH-AT, E-10-OH-NT und E-10-OH-AT-Glucuronid auf die Aufnahme von ^{14}C-Serotonin in menschliche Thrombozyten

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die hochpolaren Metaboliten des Antidepressivum Amitriptylin zu identifizieren.

Der Einsatz von ^{14}C-markiertem Amitriptylin machte es möglich, ein Isolierungsverfahren auszuarbeiten und die einzelnen Aufarbeitungsschritte zu quantifizieren. Zunächst wurde ^{14}C-AT Ratten, denen eine Gallenfistel gelegt worden war, verabreicht. Nach Ausarbeitung des Trennverfahrens nahm eine Versuchsperson radioaktiv markiertes AT ein. Im Urin dieser Versuchsperson wurde dann nach hochpolaren Metaboliten gesucht. Nach 48 Stunden waren bereits 67,0 % der eingenommenen Radioaktivität im Urin wieder ausgeschieden, 87,6 % nach 204 Stunden bzw. 8,5 Tagen. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Untersuchungen von Eschenhof und Rieder (1969) überein, die bei vier Versuchspersonen in den ersten 8 Tagen nach der Medikation von AT 68,5 % - 83,8 % der Gesamtradioaktivität im Urin wiederfanden. Crammer et al. (1968) gaben für Imipramin eine Ausscheidung im Urin von 36,6 % der eingenommenen Radioaktivität in den ersten 24 Stunden und von 65,0 % nach 72 Stunden an.

Bei späteren Aufarbeitungen wurde Galle von Ratten, die unmarkiertes AT bzw. AT-Metaboliten bekommen hatten, und Patientenharn verwendet. Dabei ermöglichte die Vorreinigung über das Adsorberharz Amberlite XAD-4 eine Entfernung störender endogener Verbindungen wie Harnstoff und Salze. White et al. (1980) fanden XAD-4 zur Isolierung von Glucuroniden besser geeignet als XAD-2, das p-Nitrophenyl-glucuronid angeblich nicht so stark adsorbiert.

Nach Entfernung der nicht konjugierten Metaboliten durch Extraktion mit Essigester bei pH 9 und pH 3 gelang durch wiederholte dünnschichtchromatographische Trennung unter Benutzung zweier verschiedener Fließmittelsysteme die Isolierung von Konjugaten von Amitriptylin-Metaboliten, die

durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf reverser Phase aufgetrennt und gereinigt wurden.

Mit den so isolierten Metaboliten wurden zunächst Versuche zum Nachweis von Glutathion-Konjugaten unternommen. Daher wurden die Rattengalle und der Menschenharn zuerst mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase behandelt, um Glucuronide und Sulfate zu spalten und die Aglyka durch Extraktion abzutrennen. In der verbliebenen Fraktion polarer Metaboliten hätten vorhandene Glutathion-Konjugate nachweisbar sein müssen. Eine Diazomethan-Behandlung des XAD-4-Eluats brachte jedoch keine Erhöhung der bei pH 9 mit Essigester extrahierbaren Metabolitenfraktion nach der Methylierung. Glutathion-Derivate von Amitriptylin hätten dabei aus einem Zwitterion in das Amin übergehen und extrahierbar werden müssen. Außerdem ließen sich in sauren Hydrolysaten isolierter Metaboliten keine Aminosäuren nachweisen.

Hinweise auf die Glucuronidbildung beim Metabolismus von AT und NT sind zahlreich (Mc Mahon et al., 1963; Borgå und Garle, 1972; Alexanderson und Borgå, 1973; Vandel et al., 1982). Jedoch wurden die Glucuronide hydroxylierter Amitriptylin-Metaboliten enzymatisch oder sauer gespalten und die entstandenen Aglyka durch Extraktion isoliert und identifiziert. So bestimmten Alexanderson und Borgå (1973) konjugiertes 10-OH-NT nach saurer Hydrolyse, indem Standards von 10-OH-NT dem gleichen Hydrolyseverfahren ausgesetzt wurden. In beiden Fällen entstand Dehydro-NT.

Lehman et al. (1983) gelang die Identifizierung des quartären N-Glucuronids von AT durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie, nachdem sich eine MS-Analyse durch Elektronenstoß oder chemische Ionisierung wegen der Hitzeempfindlichkeit und der Schwerflüchtigkeit dieses N-Glucuronids als ungeeignet erwiesen hatte. Leider blieb in der vorliegenden Arbeit die Suche nach diesem AT-N-Glucuronid erfolglos. Es konnte weder in der Glucuronid-Fraktion noch nach Aufarbeitung der mit Essigester extrahierten Fraktionen gefunden werden.

Crammer et al. (1969) spalteten die Glucuronide von Imipramin-Metaboliten durch Aufsprühen von Glucuronidase auf das Dünnschichtchromatogramm und 6-stündige Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer und wiesen die freigesetzten Phenole durch ein Farbreagenz nach.

Die Identifizierung der Glucuronide von AT-Metaboliten aus nicht enzymatisch dekonjugiertem Material gelang durch Vergleich der R_F-Werte, durch Farbreaktionen, durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie und durch ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie. So ließ sich zeigen, daß die aus der polaren Fraktion von Rattengalle und Menschenharn isolierten Konjugate Glucuronide von hydroxylierten Amitriptylin-Metaboliten waren. Aus Menschenharn konnte außerdem der Schwefelsäureester von 2-Hydroxy-nortriptylin identifiziert werden.

Auch bei den inkubierten Fraktionen konnten Glucuronide nachgewiesen werden. Jedoch war keine eindeutige Identifizierung dieser Glucuronide möglich, da die Glucuronide mit anderen polaren Substanzen verunreinigt waren.

Im Harn AT-behandelter Patienten bildet 10-OH-NT in freier und konjugierter Form den Hauptmetaboliten (Biggs et al., 1979; Vandel et al., 1982). In wesentlichen Mengen treten auch 10-OH-AT (Santagostino et al., 1974) und mehrfach aliphatisch hydroxylierte Produkte auf (Breyer-Pfaff, unveröffentlichte Ergebnisse). Phenolische Metaboliten ließen sich dagegen nur in geringen Mengen nachweisen (Breyer-Pfaff et al., 1980).

Das in der größten Menge gebildete Glucuronid war beim Menschen das O-Glucuronid von E-10-OH-NT, während die Ratte als Hauptkonjugat vor allem das O-Glucuronid von E-10-OH-AT bildete. Weitere Hauptmetaboliten waren bei der Ratte die Glucuronide von 2-Hydroxy-AT, 10,11-Dihydroxy-AT und E-10-Hydroxy-NT. Der Prozentsatz einer AT-Dosis, die zu 2-Hydroxy-AT metabolisiert wird, ist beim Menschen so gering, daß das 2-Hydroxy-AT-Glucuronid nicht isoliert werden konnte.

In Form der Glucuronide ließen sich sowohl geometrische als auch optische Isomere 10-hydroxylierter Amitriptylin-Metaboliten durch HPLC trennen.

Eine stereospezifische Hydroxylierung für NT ist von Mc Mahon et al. (1963), von Bertilsson und Alexanderson (1972) und von Mellström et al. (1982) beschrieben worden. Mellström et al. fanden bei der Hydroxylierung von NT durch menschliche Lebermikrosomen, daß das E-Isomer in weit größerer Menge gebildet wird als das Z-Isomer, dessen Bildung 13 ± 3 % der gesamten 10-Hydroxylase-Aktivität umfaßt. Auch im Harn macht die Ausscheidung von Z-10-Hydroxy-NT nur 5 - 22 % der Gesamtmenge des ausgeschiedenen 10-Hydroxy-NT aus (Mellström et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurden von den E-Isomeren sowohl von 10-Hydroxy-AT-O-Glucuronid als auch von 10-Hydroxy-NT-O-Glucuronid wesentlich größere Mengen gefunden als von den entsprechenden Glucuroniden der Z-Isomeren. Die Glucuronide, die aus Z-10-Hydroxy-AT und Z-10-Hydroxy-NT entstanden sind, hatten eine viel längere Retentionszeit bei der HPLC als jene, die aus den E-Isomeren entstanden sind.

Bei Gabe von AT, E- bzw. Z-10-Hydroxy-AT und E- bzw. Z-10-Hydroxy-NT an Ratten wurden jeweils die Glucuronide zweier isomerer 10,11-Dihydroxy-Verbindungen durch die HPLC getrennt.

Aus optischen Antipoden entsteht durch Konjugation mit Glucuronsäure ein Diastereomerengemisch, das auf Grund seiner verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften durch HPLC getrennt werden kann. Die Trennung der Glucuronide der optischen Isomeren von 10-Hydroxy-AT und 10-Hydroxy-NT scheint durch HPLC gelungen zu sein. Am eindrucksvollsten wurde diese Vermutung durch die Gabe von synthetischem, d.h. racemischem, E-10-Hydroxy-NT und von E-10-Hydroxy-NT, das als Metabolit aus Patientenharn gewonnen worden war, an zwei verschiedene Ratten bestätigt. Die Ratte, die das synthetische E-10-Hydroxy-NT bekommen hatte, bildete die beiden diastereomeren Glucuronide im Verhältnis 2,2 : 1, während

die andere Ratte zwei diastereomere Glucuronide im Verhältnis 12-13 : 1 bildete. Offensichtlich war der aus dem Patientenharn gewonnene Metabolit optisch aktiv und hatte auch laut Breyer-Pfaff (persönliche Mitteilung) die gleiche optische Drehung, die Bertilsson und Alexanderson (1972) bei E-10-Hydroxy-NT gefunden hatten, aber er war optisch wohl nicht völlig rein.

Sisenwine et al. (1982) gelang es, die diastereomeren Glucuronide von Oxazepam zu trennen, während das Aglykon racemisiert. Mascher et al. (1984) trennten die Glucuronide der optischen Isomeren von Oxazepam und von drei anderen optisch aktiven 1,4-Benzodiazepinen.

In dem beschriebenen Versuch mit synthetischem E-10-Hydroxy-NT wurden die beiden diastereomeren Glucuronide nicht im Verhältnis 1 : 1, sondern im Verhältnis 2,2 : 1 gefunden. Es hat also wahrscheinlich eine stereoselektive Glucuronidierung stattgefunden. Sisenwine et al. (1982) beschrieben eine stereoselektive Glucuronidierung von Oxazepam bei verschiedenen Spezies. Auch bei Propranolol ist von einer stereoselektiven Glucuronidierung berichtet worden (Thompson et al., 1981; Oatis et al., 1983).

Von 10-Hydroxy-AT konnten außer den diastereomeren O-Glucuroniden auch N-Glucuronide isoliert und identifiziert werden. Beim N-Glucuronid von 10-Hydroxy-AT ist im "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrum das Massenbruchstück m/z 58, das für die tertiäre Aminogruppe charakteristisch ist, nur als Untergrundsignal zu sehen, während es beim O-Glucuronid das Hauptsignal im FAB-Massenspektrum ist.

Das N-Glucuronid von E-10-Hydroxy-NT sollte vom O-Glucuronid dadurch unterscheidbar sein, daß es nicht N-acetyliert werden kann. Allerdings wurde es weder bei der Ratte noch beim Menschen gefunden.

Während die N-Glucuronidierung aliphatischer und aromatischer Amine zu Konjugaten führt, die in sauren Lösungen extrem labil sind (Bridges et al., 1962), erwiesen sich N-Glucuronide an der Sulfonimido- oder Carbamoyl-Gruppe als relativ stabil (Williams, 1967; Fishman, 1970).

Angesichts dieser Instabilität wurde in einem Versuch mit Gabe von racemischem E-10-Hydroxy-NT die Essigester-Extraktion bei pH 3 durch eine Extraktion bei pH 6 ersetzt. Trotzdem wurden keine Hinweise auf das Auftreten von N-Glucuroniden von E-10-Hydroxy-NT erhalten.

Als Hauptmetabolisierungswege von AT kann man folgende Reaktionen aufführen: die Demethylierung zur Desmethyl- bzw. zur Didesmethylverbindung, die Hydroxylierung vor allem in 10-Stellung, aber auch in 2- und in 10,11-Stellung mit anschließender Glucuronsäure-Konjugation.

Crammer et al. (1969) beschrieben als Hauptabbauwege von Imipramin die Demethylierung oder Dealkylierung und die Hydroxylierung in 2- oder 10-Stellung mit Konjugation. Im Gegensatz zu AT treten bei Imipramin die 2-hydroxylierten Metaboliten in wesentlich größerer Menge auf als die 10-hydroxylierten Verbindungen.

Nach den Ausführungen von Bickel et al. (1967) nehmen die Demethylierungsraten von methylsubstituierten Aminen normalerweise mit steigender Basizität ab. Während 40 % der Dosis von AT zu NT demethyliert werden, werden unter gleichen Inkubationsbedingungen aus NT nur noch 9 % Didesmethyl-AT gebildet. Für Imipramin zu Desmethylimipramin beträgt die Demethylierungsrate 57 % ; vom gebildeten Desmethylimipramin werden nur noch 5 % zu Didesmethylimipramin demethyliert.

Dennoch zeigte die Behandlung von Ratten mit NT, daß das O-Glucuronid von E-10-Hydroxy-didesmethyl-AT leichter gebildet wird als das N-Glucuronid von E-10-Hydroxy-NT. Trotz der in vitro höheren Demethylierungsrate von AT zu NT wird außer dem O-Glucuronid von 10-Hydroxy-AT auch das N-Glucuronid gebildet, und zwar sowohl vom E- als auch vom Z-Isomeren. Seltsamerweise wird bei Z-10-Hydroxy-AT das N-Glucuronid in größerer Menge gebildet als das O-Glucuronid.

Bei der Gabe von E- bzw. Z-10-Hydroxy-AT an Ratten entstand als Metabolit auch das entsprechende 10-Hydroxy-NT-Glucuronid. Das zeigt, daß 10-Hydroxy-NT nicht nur aus der Ausgangsverbindung AT oder NT, sondern auch über 10-Hydroxy-AT entstehen kann, daß also das hydroxylierte Produkt als Substrat für das N-demethylierende Enzym dienen kann.

Primäre und sekundäre Aminogruppen werden nicht konjugiert, während die tertiäre Aminogruppe selbst dann N-glucuronidiert wird, wenn eine oder zwei Hydroxylgruppen im Molekül sind.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen, bei denen kein N-Glucuronid von 10-Hydroxy-NT, wohl aber von 10-Hydroxy-AT gefunden wurde, beschrieben Bickel et al. (1973) die Identifizierung eines N-Glucuronids von Desmethylimipramin, während beim tertiären Amin Imipramin angeblich keine N-Glucuronid-Bildung stattgefunden haben soll. Allerdings erfolgte die Identifizierung bei Bickel et al. nur auf Grund unterschiedlicher Hydrolysebedingungen, während in der vorliegenden Arbeit sowohl Aglykon und Glucuronsäure durch DC und Farbreaktionen, als auch die Bindungsstelle der Glucuronsäure durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie nachgewiesen wurde. Auch sei noch einmal auf die Veröffentlichung von Lehman et al. (1983) hingewiesen, die die N-Glucuronide von Amitriptylin, Imipramin und Chlorpromazin beim Menschen durch FAB-Massenspektrometrie identifizierten.

Bei der Aufarbeitung der Gallen zweier Ratten, denen NT verabreicht worden war, wurde auch das O-Glucuronid von E-10-Hydroxy-AT isoliert. Bei der Metabolisierung muß also eine Methylierung stattgefunden haben. Die N-Methylierung von sekundären zu tertiären Aminen wurde in vivo schon für Desmethylimipramin beschrieben (Dingell und Sanders, 1966; Narasimhachari et al., 1981).

Den Abschluß der Arbeit bildete die pharmakologische Testung einzelner isolierter Metaboliten. Dabei wurde die Hemmung der Serotonin-Aufnahme in menschliche Thrombozyten untersucht.
Potter et al. (1979) berichteten, daß hydroxylierte Metaboliten von Imipramin und Amitriptylin die Serotonin- und Noradrenalin-Aufnahme in Rattenhirnsynaptosomen hemmten.

Bertilsson et al. (1979) beschrieben die Hemmung der Noradrenalin-Aufnahme in Rattenhirnschnitte durch E-10-Hydroxynortriptylin, während hydroxylierte Metaboliten von Amitriptylin und Nortriptylin die neuronale Aufnahme von Serotonin nicht hemmten.

Die getesteten Metaboliten von Amitriptylin zeigten keine biologische Aktivität im pharmakologischen Test. So hemmten E-10-Hydroxy-amitriptylin-glucuronid und E-10-Hydroxynortriptylin die Serotonin-Aufnahme in menschliche Thrombozyten gar nicht und E-10-Hydroxy-amitriptylin erst bei Konzentrationen, die bei der Metabolisierung von Amitriptylin im menschlichen Körper nicht erreicht werden.

Zum Schluß stellt sich die Frage, ob man das Schicksal von Amitriptylin an Hand der in Rattengalle und im menschlichen Harn quantifizierten Metaboliten vollständig aufklären kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch, eine Bilanz zu ziehen, nicht unternommen, sondern es war versucht worden, die nativen polaren Metaboliten zu identifizieren.

Von einer anderen Arbeitsgruppe liegen zwar Bilanzierungsversuche vor, bei denen aber nicht die nativen Metaboliten isoliert und quantifiziert wurden, sondern Dekonjugationsreaktionen vorausgingen, die zum Teil nicht die ursprünglichen Aglyka freisetzten, sondern durch Wasserabspaltung entstandene Produkte (Vandel et al., 1982).

Bickel und Weder (1968) stellten bei der Untersuchung des Imipramin-Metabolismus bei Ratten fest, daß mehr als 40 % der Dosis als Glucuronide im Urin ausgeschieden wurden. Crammer et al. (1969) sprachen von 48 % Glucuroniden nach 3-wöchiger Imipramin-Behandlung. Vandel et al. (1982) fanden 68,3 % der Dosis im Urin von Amitriptylin-behandelten Patienten wieder, 68,6 % davon als Konjugate; d.h. 46,9 % der Dosis wurden als Konjugate ausgeschieden.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden die nativen Glucuronide isoliert, aber nur näherungsweise quantifiziert. Eine genaue Messung der gebildeten Glucuronide ist anzustreben, aber sie wird weitere Verbesserungen der Aufarbeitungsmethode - auch im Hinblick auf Verluste - nötig machen.
Die Vielzahl der gefundenen Metaboliten erschwerte außerdem ihre Quantifizierung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die bei der Metabolisierung von Amitriptylin und Nortriptylin entstehenden polaren Verbindungen, die sich nicht aus wäßriger Lösung in organische Lösungsmittel extrahieren lassen, untersucht.

Die Galle von Gallenfistel-Ratten, die ^{14}C-Amitriptylin, unmarkiertes Amitriptylin, Nortriptylin, E- bzw. Z-10-Hydroxy-amitriptylin oder E- bzw. Z-10-Hydroxy-nortriptylin i.p. bei einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten, wurde 8 Stunden lang gesammelt. Der Urin von einem Patienten unter Amitriptylin-Behandlung (150 mg/Tag) und von einem Freiwilligen, der 49 mg ^{14}C-markiertes Amitriptylin eingenommen hatte, wurde ebenfalls gesammelt.

Durch Adsorption an das Adsorberharz Amberlite XAD-4 und Elution der polaren Metaboliten mit Methanol wurden endogene Verbindungen,durch Extraktion mit Essigester die unpolaren Metaboliten entfernt. Nach zwei aufeinanderfolgenden dünnschichtchromatographischen Reinigungen wurden die Fraktionen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf reverser Phase getrennt. Die Strukturen der einzelnen Verbindungen wurden durch "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie, durch ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie und durch dünnschichtchromatographische Identifizierung der Spaltprodukte nach saurer oder enzymatischer Hydrolyse aufgeklärt.

Während die Suche nach Glutathion-Konjugaten erfolglos war, wurden die isolierten Metaboliten überwiegend als Glucuronide identifiziert.

Die isolierten Metaboliten waren zum größten Teil Glucuronide 10-hydroxylierter und 10,11-dihydroxylierter Derivate von Amitriptylin und Nortriptylin. Daneben traten bei der Ratte die Glucuronide von 2-Hydroxy-amitriptylin und -nortriptylin, beim Menschen der Schwefelsäurester von 2-Hydroxy-nortriptylin auf.

In Form der Glucuronide ließen sich sowohl geometrische als auch optische Isomere 10-hydroxylierter Metaboliten trennen. Die Glucuronide, die aus Z-10-Hydroxy-amitriptylin und -nortriptylin entstanden sind, hatten eine wesentlich längere Retentionszeit bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie als die Glucuronide der E-Isomeren.

Von den 10,11-Dihydroxy-Derivaten von Amitriptylin und Nortriptylin wurden die Glucuronide zweier isomerer Verbindungen isoliert.

Bei E- und Z-10-Hydroxy-amitriptylin sowie bei E- und Z-10-Hydroxy-nortriptylin ließen sich die enantiomeren Alkohole in Form ihrer diastereomeren Glucuronide durch HPLC trennen. Dies wurde bestätigt durch Gabe von racemischem bzw. optisch aktivem E-10-Hydroxy-nortriptylin an zwei verschiedene Ratten.

Von E- und Z-10-Hydroxy-amitriptylin und 10,11-Dihydroxy-amitriptylin konnten außer den diastereomeren O-Glucuroniden auch die N-Glucuronide isoliert und identifiziert werden. Beim N-Glucuronid von E- und Z-10-Hydroxy- und 10,11-Dihydroxy-amitriptylin ist im "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrum das Massenbruchstück m/z 58, das für die tertiäre Aminogruppe charakteristisch ist, nur als Untergrundsignal zu sehen, während es beim O-Glucuronid das Hauptsignal ist. Von E- und Z-10-Hydroxy- und 10,11-Dihydroxy-nortriptylin wurden keine N-Glucuronide gefunden.

Die pharmakologische Testung einzelner isolierter Metaboliten ließ keine biologische Aktivität erkennen. Die Serotonin-Aufnahme in menschliche Thrombozyten wurde durch die untersuchten Metaboliten nicht oder erst bei Konzentrationen, die unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht werden, gehemmt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ABOU-EL-MAKAREM, M.M., MILLBURN, P., SMITH, R.L., WILLIAMS, R.T.: Biliary excretion of foreign compounds: species differences in biliary excretion. Biochem. J. 105, 1289-1293 (1967)

ALEXANDERSON , B., BORGÅ, O.: Urinary excretion of nortriptyline and five of its metabolites in man after single and multiple oral dosis. Eur. J. Clin. Pharmacol. 5, 174-180 (1973)

ANDERSON, B.N., HERRIKSON, J.R.: Jaundice and eosinophilia associated with amitriptyline. J. Clin. Psychiatry 39, 730-731 (1978)

BAKER, J.R., CHAYKIN, S.: The biosynthesis of trimethylamine-N-oxide. J. Biol. Chem. 237, 1309-1313 (1962)

BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D., TYLER, A.N. : Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 7, 325-327 (1981a)

BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D., TYLER, A.N.: Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. Nature 293, 270-275 (1981b)

BARBER, M., BORDOLI, R.S., ELLIOTT, G.J., SEDGWICK, R.D., TYLER, A.N.: Fast atom bombardment mass spectrometry. Anal. Chem. 54, 645A-657A (1982)

BERTILSSON, L., ALEXANDERSON, B.: Stereospecific hydroxylation of nortriptyline in man in relation to interindividual differences in its steady-state plasma level. Eur. J. Clin. Pharmacol. 4, 201-205 (1972)

BERTILSSON, L., MELLSTRÖM, B., SJÖQVIST, F.: Pronounced inhibition of noradrenaline uptake by 10-hydroxy-metabolites of nortriptyline. Life Sci 25, 1285-1292 (1979)

BICKEL, M.H., FLÜCKINGER, M., BAGGIOLINI, M.: Vergleichende Demethylierung von tricyclischen Psychopharmaka durch Rattenleber-Mikrosomen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. Exp. Path. 256, 360-366 (1967)

BICKEL, M.H., WEDER, H.J.: The total fate of a drug: kinetics of distribution, excretion, and formation of 14 metabolites in rats treated with imipramine. Arch. Int. Pharmcodyn. 173, 433-463 (1968)

BICKEL, M.H., MINDER, R., DI FRANCESCO, C.: Formation of N-glucuronide of desmethylimipramine in the dog. Experientia 29, 960-961 (1973)

BIGGS, S.R., CHASSEAUD, L.F., HAWKINS, D.R., MIDGLEY, I.: Determination of amitriptyline and its major basic metabolites in human urine by HPLC. Drug Metab. Disp. 7, 233-236 (1979)

BOCK, K.W., WHITE, I.N.H.: UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes: influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Eur. J. Biochem. 46, 451-459 (1974)

BOCK, K.W., VAN ACKEREN, G., LORCH, F., BIRKE, F.W.: Metabolism of naphthalene to naphthalene dihydrodiol glucuronide in isolated hepatocytes and in liver microsomes. Biochem. Pharm. 25, 2351-2356 (1976)

BÖTTCHER, J.: Der Phase-II-Metabolismus von Antipyrin (Phenazon) bei Mensch und Ratte. Isolierung, Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung der Konjugationsprodukte. Dissertation Braunschweig, Techn. Univ., Naturwiss. Fakultät (1982)

BORCHERT, H.H., BORNSCHEIN, J., PFEIFER, S., KRAFT, R.: Biotransformation von 9.9-Dioxopromethazin (Prothanon). Pharmazie 32, 489-496 (1977)

BORGÅ, O., GARLE, M.: A gas chromatographic method for the determination of nortriptyline and some of its metabolites in human plasma and urine. J. Chromatogr. 68, 77-88 (1972)

BOYLAND, E., WILLIAMS, K.: An enzyme catalysing the conjugation of epoxides with glutathione. Biochem. J. 94, 190-197 (1965)

BREYER-PFAFF, U., PROX, A., REUTER, A., YAO, P.P.: Formation of phenolic metabolites from amitriptyline and nortriptyline in man and rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, Suppl. R 17 (1980)

BRIDGES, J.W., WILLIAMS, R.T.: N-Glucuronide formation in vivo and in vitro. Biochem. J. 83. P 27 (1962)

CHRISTIANSEN, J., GRAM, L.F., KOFOD, B., RAFAELSEN, O.J.: Imipramine metabolism in man. A study of urinary metabolites after administration of radioactive imipramine. Psychopharmacologia 11, 255-264 (1967)

COPE, A.C., FOSTER, T.T., TOWLE, Ph.H.: Thermal decomposition of amine oxides to olefins and dialkylhydroxylamines. J. Amer. Chem. Soc. 71, 3929-3934 (1949)

COPE, A.C., MC LEAN, D.C., NELSON, N.A.: Cyclic polyolefins. XXXVI. Trans-cyclononene and trans-cyclodecene from cyclononyldimethylamine oxide and cyclodecyldimethylamine oxide. J. Amer. Chem. Soc. 77, 1628-1631 (1955)

CORONA, G.L., FACINO, R.M.: Identification and evaluation of amitriptyline and its basic metabolites in rabbits urine. Biochem. Pharmacol. 17, 2045-2050 (1968)

CRAMMER, J.L., SCOTT, B., WOODS, H., ROLFE, B.: Metabolism of ^{14}C-imipramine. I. Excretion in the rat and in man. Psychopharmacologia (Berl.) 12, 263-277 (1968)

CRAMMER, J.L., SCOTT, B., ROLFE, B.: Metabolism of ^{14}C-imipramine. II. Urinary metabolites in man. Psychopharmacologia (Berl.) 15, 207-225 (1969)

DE LEENHEER, A., HEYNDRICKX, A.: Identification of a major metabolite of nortriptyline in human urine. J. Pharm. Sci. 60, 1403-1405 (1971)

DINGELL, J.V., SANDERS, E.: Methylation of desmethylimipramine by rabbit lung in vitro. Biochem. Pharmacol. 15, 599-605 (1966)

DUTTON, G.J. in: Glucuronic acid, free and combined. Dutton, G.J., Hrsg., Academic Press, New York, S. 185-299 (1966)

ESCHENHOF, E., RIEDER, J.: Untersuchungen über das Schicksal des Antidepressivums Amitriptylin im Organismus der Ratte und des Menschen. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 19, 957-966 (1969)

FACINO, R.M., SANTAGOSTINO, G., CORONA, G.L.: Presence of an acid metabolite of amitriptyline in rabbit urine. Biochem. Pharmacol. 19, 1503-1505 (1970)

FENSELAU, C., JOHNSON, L.P.: Analysis of intact glucuronides by mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. Drug Metab. Disp. 8, 274-283 (1980)

FISHMAN, V., GOLDENBERG, H.: Identification of a new metabolite of imipramine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 187-190 (1962)

FISHMAN, W.H. (Hrsg.): Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis Vol. 1. Academic Press, New York and London (1970)

FRIGERIO, A., CAVO-BRIONES, M., BELVEDERE, G.: Formation of stable epoxides in the metabolism of tricyclic drugs. Drug Metab. Rev. 5, 197-218 (1976a)

FRIGERIO, A., PANTAROTTO, C.: Epoxide-diol pathway in the metabolism of tricyclic drugs. J. Pharm. Pharmacol. 28,665-666 (1976b)

GOLDENBERG, H., FISHMAN, V., HEATON, A., BURNETT, R.: A detailed evaluation of promazine metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 1044-1051 (1964)

GROVER, P.L., HEWER, A., SIMS, P.: Formation of K-region epoxides as microsomal metabolites of pyrene and benzo(a)pyrene. Biochem. Pharmacol. 21, 2713-2726 (1972)

HAMMAR, C.G., ALEXANDERSON, B., HOLMSTEDT, B., SJÖQVIST, E.: Gas chromatography-mass spectrometry of nortriptyline in body fluids of man. Clin. Pharmacol. Ther. 12, 496-505 (1971)

HORNING, M.G., HARVEY, D.J., HORNING, E.C., HILL, R.M. in: Proceedings of the international symposium on gas chromatography-mass spectrometry. Frigerio, A., Hrsg., Tamburini, Milan, S. 403-429 (1972)

HOWIE, D., ADRIAENSSENS, P.J., PRESCOTT, L.F.: Paracetamol metabolism following overdosage: application of high performance liquid chromatography. J. Pharm. Pharmacol., 29, 235-237 (1977)

HUCKER, H.B., BALLETTO, A.J., DEMETRIADES, J., ARISON, B.H., ZACCHEI, A.G.: Urinary metabolites of amitriptyline in the dog. Drug Metab. Disp. 5, 132-142 (1977)

JERINA, D.M., DALY, J.W.: Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. Science 185, 573-582 (1974)

KEYSELL, G.R., BOOTH, J., SIMS, P., GROVER, P.L., HEWER, A.: The formation of an epoxide in the microsomal metabolism of 7.12-Dimethylbenz(a)anthracene. Biochem. J. 129, P 41-42 (1972)

KNAPP, D.R., GAFFNEY, T.E., MC MAHON, R.E., KIPLINGER, G.: Studies of human urinary and biliary metabolites of nortriptyline with stable isotope labeling. J. Pharmacol. Exp. Ther. 180, 784-790 (1972)

KREBS, K.G., HEUSSER, D., WIMMER, H. in: Dünnschichtchromatographie. Stahl, E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin S. 813-856, 2.Auflage (1967)

LEHMAN, J.P., FENSELAU, C., DEPAULO, J.R.: Quaternary ammonium-linked glucuronides of amitriptyline, imipramine, and chlorpromazine. Drug Metab. Disp. 11, 221-225 (1983)

LINGJÆRDE, O.: Inhibitory effect of clomipramine and related drugs on serotonin uptake in platelets: more complicated than previously thought. Psychopharmacology 61, 245-249 (1979a)

LINGJÆRDE, O.: Inhibition of platelet uptake of serotonin in plasma from patients treated with clomipramine and amitriptyline. Eur. J. Clinic. Pharmacol. 15, 335-340 (1979b)

LOWRY, O.H., RESEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MASCHER, H., NITSCHE, V., SCHÜTZ, H.: Separation, isolation and identification of optical isomers of 1,4-benzodiazepine glucuronides from biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 306, 231-239 (1984)

MC MAHON, R.E., MARSHALL, F.J., CULP, H.W., MILLER, W.H.: The metabolism of nortriptyline-N-methyl-^{14}C in rats. Biochem. Pharmacol. 12, 1207-1217 (1963)

MELLSTRÖM, B., BERTILSSON, L., SÄWE, J., SCHULZ, H.-U., SJÖQVIST, F.: E- and Z-10-hydroxylation of nortriptyline: relationship to polymorphic debrisoquine hydroxylation. Clin. Pharmacol. Ther. 30, 189-193 (1981)

MELLSTRÖM, B., BERTILSSON, L., BIRGERSSON, C., GÖRANSSON, M., VON BAHR, C.: E- and Z-10-hydroxylation of nortriptyline by human liver microsomes - methods and characterization. Drug Metab. Disp. 11, 115-119 (1982)

MICHEL, W.R.: Metabolism of linear alkylate sulfonate and alkyl benzene sulfonate in albino rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 12, 473-485 (1968)

MILLBURN, P., SMITH, R.L., WILLIAMS, R.T.: Biliary excretion of foreign compounds: biphenyl, stilboestrol and phenolphthalein in the rat: molecular weight, polarity and metabolism as factors in biliary excretion. Biochem. J. 105, 1275-1281 (1967)

MORGAN, D.H.: Jaundice associated with amitriptyline. Brit. J. Psychiat. 115, 105-106 (1969)

NARASIMHACHARI, N., SAADY, J., FRIEDEL, R.O.: Quantitative mapping of metabolites of imipramine and desipramine in plasma samples by gas chromatography mass spectrometry. Biol. Psychiatry 16, 937-944 (1981)

NETTER, K.J.: Eine Methode zur direkten Messung der O-Demethylierung in Lebermikrosomen und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak. 238, 292-300 (1960)

OATIS, J.E., BAKER, J.P., MC CARTHY, J.R., KNAPP, D.R.: Synthesis and chromatographic separation of the glucuronids of (R)- and (S)-propranolol. J. Med. Chem. 26, 1687-1691 (1983)

OESCH, F.: Mammalian epoxide hydrases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. Xenobiotica 3, 305-340 (1973)

PASTUSKA, G.: Untersuchungen über die qualitative und quantitative Bestimmung der Zucker mit Hilfe der Kieselgel-Schicht-Chromatographie. Z. Analyt. Chemie 179, 427-429 (1961)

PATAKI, G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäuren- und Peptid-Chemie. Walter de Gruyter & Co., 1966

PFAFF, E.: Unspezifische Permeabilität und spezifischer Austausch der Adeninnucleotide als Beispiel mitochondrialer Compartmentierung. Dissertation Univ. Marburg, Naturwiss. Fakultät (1965)

POTTER, W.Z., CALIL, H.M., MANIAN, A.A., ZAVADIL, A.P., GOODWIN, F.K.: Hydroxylated metabolites of tricyclic antidepressants: preclinical assessment of activity. Biol. Psychiatry 14, 601-613 (1979)

PREY, V., BERBALK, H., KAUSZ, H.: Beiträge zur Chromatographie organischer Substanzen. VI. Die Dünnschichtchromatographie der Kohlenhydrate. Mikrochim. Acta 6, 968-978 (1961)

RAAFLAUB, J.: Zum Metabolismus des Chlorprothixen. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 17, 1393-1395 (1967)

RANDERATH,K.: Dünnschicht-Chromatographie. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr., 2.Aufl. (1965)

RÖLLGEN,F.W.: "Fast Atom Bombardment"-Massenspektrometrie. Nachr. Chem. Tech. Lab. 31, 174-177 (1983)

SANTAGOSTINO, G., FACINO, R.M., PIRILLO, D.: Urinary excretion of amitriptyline N-oxide in humans. J. Pharm. Sci. 63, 1690-1692 (1974)

SEILER, N., WIECHMANN, M.: Zum Nachweis von Aminosäuren im 10^{-10} Mol-Maßstab, Trennung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen. Experientia 20, 559-560 (1964)

SISENWINE, S.F., TIO, C.O., HADLEY, F.V., LIU, A.L., KIMMEL, H.B., RUELIUS, H.W.: Species related differences in the stereoselective glucuronidation of oxazepam. Drug Metab. Disp. 10, 605-608 (1982)

SMITH, R.L.: The biliary excretion and enterohepatic circulation of drugs and other organic compounds. Prog. Drug Res. 9, 299-360 (1966)

SMITH, R.L., WILLIAMS, R.T. in: Glucuronic acid, free and combined. Dutton, G.J., Hrsg., Academic Press, New York, S. 457-491 (1966)

STRAFFORD, M., KELLERMANN, G., STILLWELL, R.N., HORNING, M.G.: Metabolism of antipyrine by the epoxide-diol pathway in the rat, guinea pig and human. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 8, 593-606 (1974)

SURMANN, D.J., VICKERMAN, J.C.: Fast atom bombardment quadrupole mass spectrometry. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 7, 324-325 (1981)

TAPUHI, Y., SCHMIDT, D.E., LINDNER, W., KARGER, B.L.: Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. Analyt. Biochem. 115, 123-129 (1981)

THOMPSON, J.A., HULL, J.E., NORRIS, K.J.: Glucuronidation of propranolol and 4'hydroxypropranolol. Substrate specifity and stereoselectivity of rat liver microsomal glucuronyltransferases. Drug Metab. Disp. 9, 466-471 (1981)

VANDEL, B., SANDOZ, M., VANDEL, S., ALLERS, G., VOLMAT, R.: Biotransformation of amitriptyline in depressive patients: urinary excretion of seven metabolites. Eur. J. Clin. Pharmacol 22, 239-245 (1982)

WERKHEISER, W.C., BARTLEY, W.: The study of steady-state concentrations of internal solutes of mitochondria by rapid centrifugal transfer to fixation medium. Biochem. J. 66, 79-91 (1957)

WHITE, J.D., SCHWARTZ, D.P.: Evaluation of Amberlite XAD-4 for recovery of glucuronides and sulfates from aqueous solution. J. Chromatogr. 196, 303-308 (1980)

WHITNACK, E., KNAPP, D.R., HOLMES, J.C., FOWLER, N.O., GAFFNEY, T.E.: Demethylation of nortriptyline by the dog lung. J. Pharmacol. Exp. Ther. 181, 288-291 (1972)

WILLIAMS, R.T.: Ciba Found. Symp. Drug Responses in Man S. 83 (1967), zitiert nach FISHMAN, W.H. (1970)

YON, J., ANURAS, S.: Hepatitis caused by amitriptyline therapy. JAMA 232, 833-834 (1975)

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. U. Breyer-Pfaff für die wertvollen Anregungen, die freundliche Unterstützung und die vielen guten Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Apotheker H.-P. Böhne möchte ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Durchführung der pharmakologischen Testung von Amitriptylin-Metaboliten danken.

Frau M. Müh-Zange und Herrn R. Wiatr danke ich für die technischen Hilfeleistungen, Herrn W. Schneck für die sorgfältige Betreuung der Versuchstiere.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. A. Prox und Herrn H. Wachsmuth für die Messungen und Interpretationen der "Fast Atom Bombardment"-Massenspektren und der Kernresonanzspektren.

Lebenslauf

4. März 1956	geboren in Bad Mergentheim als Tochter des Josef Baier und seiner Ehefrau Edeltrud, geb. Heiob
April 1963 bis November 1966	Grundschule in Bad Mergentheim
Ab Dezember 1966	Deutschorden-Gymnasium in Bad Mergentheim
10. Juni 1975	Abitur
August 1975 bis September 1975	Ausbildung zur Schwesternhelferin beim Malteser Hilfsdienst in Freiburg i. Breisgau
November 1975 bis März 1976	Schwesternhelferin auf der Pflegestation des Eduard-Mörike-Hauses, einem Altersheim, in Bad Mergentheim
April 1976	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität Tübingen
5. September 1979	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bestanden
Oktober 1979 bis März 1980	Praktische Ausbildung nach § 3 der Approbationsordnung für Apotheker in der Post-Apotheke in Tübingen
April 1980 bis September 1980	Zweite Hälfte der praktischen Ausbildung in der Apotheke des Krankenhauses Nordwest in Frankfurt/Main
12. Januar 1981	Approbation als Apotheker
Januar 1981 bis Juni 1984	Anfertigung der Dissertation "Polare Metaboliten des Antidepressivum Amitriptylin bei Ratte und Mensch: Isolierung und Strukturaufklärung" unter Anleitung von Frau Prof Dr. Dr. U. Breyer-Pfaff am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Seit 23. September 1982	verheiratet mit dem Rechtsreferendar Waldemar Weber

Meine akademischen Lehrer waren neben
Frau Prof. Dr. Dr. U. Breyer-Pfaff
die Herren Professoren und Dozenten:

A.-W. Alfermann
H.P.T. Ammon
H. Auterhoff
R.-E. Bader
O. Brösamle
K.H. Gaukler
H. Hamacher
K.-A. Kovar
E. Lindner
E. Mechler
W. Nackel
H. Pommer
E. Reinhard
H. Schilcher
J.E. Schultz
H. Seiler
M. Siess
E. Verspohl
D. Winne